Neue Inhaltsstoffe von Lignum Quassiae und eine neue Gehaltsbestimmung der Quassia-Bitterstoffe

Thomas Nestler

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0058

Neue Inhaltsstoffe von Lignum Quassiae und eine neue Gehaltsbestimmung der Quassia-Bitterstoffe

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Thomas Nestler

aus

München

Februar 1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. Th. S e v e r i n

Tag der mündlichen Prüfung: 16.5.1979

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Madelon gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
ALLGEMEINER TEIL	2
1.0 Herkunft und Beschreibung der Droge	2
1.1 Mikroskopische und dünnschichtchromatographische Unterscheidung von Surinam-Quassiaholz und Jamaika-Quassiaholz	3
1.2 Bisher bekannte Inhaltsstoffe von Lignum Quassiae	6
1.3 Therapeutische Anwendung und Pharmakologie . . .	10
2.0 Versuche zur Lokalisierung des kardiotonen Wirkprinzips	11
2.1 Prüfung des Quassia-Extraktes auf inotrope Wirksamkeit	12
3.1 Dünnschichtchromatographisches Screening des Drogenextraktes	13
3.2 Anreicherung und Überprüfung der Alkaloidfraktion	13
3.3 Isolierung der Alkaloide I-IV und der Verbindung V	15
4.0 Strukturaufklärung der Alkaloide	18
4.1 Alkaloid I	18
4.2 Alkaloid II und III	28
4.3 Alkaloid IV	33
4.4 Verbindung V	35
5.0 Zusammenfassung der pharmakologischen Testergebnisse	36
6.0 Quantitative Bitterstoffbestimmung	38
6.1 Bisherige analytische Untersuchungsmethoden der Arzneibücher	38
6.2 Aufgabenstellung	39
6.3 Isolierung der Bitterstoffe	40
6.4 Spektroskopie der Quassia-Bitterstoffe	43
6.5 Sensorische Analyse	48
6.6 Quantitative Extraktion der Bitterstoffe aus der Droge	51
6.7 Wahl einer geeigneten Bestimmungsmethode	53
6.8 Bestimmungen aus dem Pflanzenmaterial	58

Seite

6.9 Vergleich mit anderen Bestimmungsmethoden . . . 63
6.10 Umrechnung von Bitterstoffgehalt auf Bitterwert 68
6.11 Stabilität der Quassia-Bitterstoffe in der Droge und als Reinsubstanzen 71

ZUSAMMENFASSUNG 72

EXPERIMENTELLER TEIL 75
7.0 Herkunft der Drogen 75
8.0 Allgemeine Arbeitsmethoden 75
8.1 Dünnschichtchromatographie 75
8.2 Säulenchromatographie 77
8.3 Auftragegeräte für die DC 78
8.4 Reinheit der Lösungsmittel 78
8.5 Physikalisch-chemische Untersuchungen 78
8.6 Test auf positiv inotrope Aktivität 80
9.0 Spezielle Arbeitsmethoden 81
9.1 Dünnschichtchromatographisches Drogenscreening . 81
9.2 Isolierung der Alkaloide 83
9.3 Isolierung der Bitterstoffe aus Handels-Quassin 86
9.4 Quassin-Darstellung durch Oxidation von Neoquassin (nach VALENTA et al.) 88
9.5 Quassin-Neoquassin-Trennung durch Alkalibehandlung nach LONDON et al.) 88
9.6 Isolierung der Bitterstoffe Quassin und Neoquassin aus der Droge 89
10.0 Meßdaten 89
10.1 Meßdaten der Quassia-Bitterstoffe 89
10.2 Meßdaten der isolierten Alkaloide 91
10.3 Meßdaten von Verbindung V 94
10.4 Einzelergebnisse der pharmakologischen Testung . 95
11.0 Quantitative Bestimmung der Quassia-Bitterstoffe 96
11.1 Aufstellung der Eichgeraden von Quassin, Neoquassin und 18-Hydroxyquassin 96
11.2 Quantitative Bestimmung der Bitterstoffe im Drogenextrakt 100
11.3 Sensorische Bitterwertbestimmung 107

LITERATURVERZEICHNIS 111

E I N L E I T U N G

Das Holz von Quassia amara und Picrasma excelsa gehört zu den bitter schmeckendsten Drogen, die seit Jahrhunderten verwendet werden. Obwohl die Hauptbitterstoffe der beiden Drogen schon seit einiger Zeit strukturell bekannt sind, gab es bisher nur sensorisch durchgeführte Methoden zur Wertbestimmung der Droge. Außerdem weisen schon im Jahre 1929 durchgeführte pharmakologische Arbeiten daraufhin, daß der Droge eine deutliche cardiotone Wirkung zukommt. Ob diese Wirkung den Bitterstoffen zuzuschreiben ist, oder von anderen bisher unbekannten Verbindungen stammt, war bisher ungeklärt.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, 1. eine nichtsensorische, neue Wertbestimmung der Quassiadroge zu entwickeln und 2. das cardiotone Wirkprinzip der Droge zu "orten", zu isolieren und soweit möglich strukturell aufzuklären.

A L L G E M E I N E R T E I L

1.0 Herkunft und Beschreibung der Droge

Bitterstoffdrogen aus der Familie der Simaroubaceae gehörten schon seit undenklichen Zeiten zum Arzneischatz der Indianer im Amazonasgebiet. Sie waren dort unter dem allgemeinen Namen "Maruba" (= Bitterbaum) bekannt (1).

Quassia amara wurde erstmals in einer Beschreibung der Kolonie Surinam im Jahre 1714 erwähnt (2). Die Bezeichnung "Quassia" stammt von einem berühmten heilkundigen Eingeborenen namens "Quassi", der die Droge zur Behandlung bösartiger Fieberanfälle verwendet haben soll (3). Nach einer Beschreibung in einer Schrift LINNES wurde die Droge 1756 vom schwedischen Forscher ROLANDER (4) nach Europa gebracht, worauf sie dann im Jahre 1788 Aufnahme in die damalige Pharmakopoe von London fand (2). Von da an war "Lignum Quassiae" in fast allen europäischen Arzneibüchern offizinell. Heute findet sich die Droge noch im British Pharmaceutical Codex (1968) , in The Dispensatory of the United States of America (1960) und in der Pharmacopee Francaise IX (1976) .

Da für Lignum Quassiae in den meisten Arzneibüchern zwei Stammpflanzen zugelassen sind (Tab. 1, S. 3), findet man im Handel für die Droge je nach ihrer botanischen und geographischen Herkunft zwei Bezeichnungen.

Das sogenannte Surinam-Quassiaholz stammt von Quassia amara L., einem kleinen Baum oder Strauch der in Surinam, Brasilien, Kolumbien und Panama heimisch ist. Das Jamaika-Quassiaholz wird von Picrasma excelsa (Swartz) Planchon (= Picraena excelsa Lindl. = Aeschrion excelsa Kuntze, = Quassia excelsa Swartz, = Simaruba excelsa, DC) einem auf Jamaika und den Westindischen Inseln wachsenden, bis zu 30 Meter hohen Baum gewonnen. Beide Arten, die sich mikroskopisch gut unterscheiden lassen (5) enthalten die gleichen Bitterstoffe, allerdings in unterschiedlicher Konzentration. Das

Holz von Quassia amara besitzt einen Bitterstoff-Gehalt bis zu 0.25%, während Picrasma excelsa-Holz Gehalte bis zu 0.08% aufweisen soll. In der indischen Ph.(1953) war das Holz einer dritten Art, Picrasma quassinoides Benn. vorgeschrieben. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über das Vorkommen und die zugelassenen Stammpflanzen in den einzelnen Pharmakopoeen.

T a b e l l e 1

Lignum Quassiae	
Stammpflanze:	offizinell in:
Picrasma excelsa und Quassia amara	Ph.Belg.IV.,DAB 6,Ph.Dan.IX, Egypt.Ph., Ph.Helv.V.,Ph.Hisp.IX, Ph.Ital.VI.,Ph.Mex.52,Ph.Ned.VI., Ph.Norv.V.,Ph.Sued.46,HAB.CF IX.
Nur Picrasma excelsa	B.Ph.1953, BPC 1968.
Nur Picrasma quassinoides	Ph.Ind.1953.

1.1 Mikroskopische und dünnschichtchromatographische Unterscheidung von Surinam-Quassiaholz und Jamaika Quassiaholz

Mikroskopische Unterscheidung:

Gemeinsam sind beiden Arten: dickwandige Fasern, weitlumige Gefäße, von schmalen Parenchymbändern umlagert, Tüpfelgefäße mit spaltenförmig behöften Tüpfeln, einzeln oder zu 2 bis 5 in Gruppen. Ist Rinde beigemengt, so sind Steinzellen, Stärke und vereinzelt Oxalatdrusen zu finden.

Charakteristisch für Surinam-Quassia sind Markstrahlen, die höchstens ein bis zwei Zellreihen breit und zwanzig bis fünfundzwanzig Zellreihen hoch sind, während Jamaika-Quassia durch zwei bis fünf Zellreihen breite Markstrahlen gekennzeichnet ist.

Oxalatkristalle fehlen im Holz von Surinam-Quassia fast völlig, während sie im Holz von Jamaika-Quassia in Form von Einzelkristallen oder Kristallsand zu finden sind.

Dünnschichtchromatographische Unterscheidung:

Zur DC-Unterscheidung können einfache, durch Wärmeextraktion am Rückfluß hergestellte methanolische Auszüge verwendet werden. Als bestes Laufmittelsystem bewährte sich ein Chloroform-Methanol-Gemisch, das in ähnlicher Zusammensetzung zur DC terpenoider Bitterstoffe Anwendung gefunden hat (6).

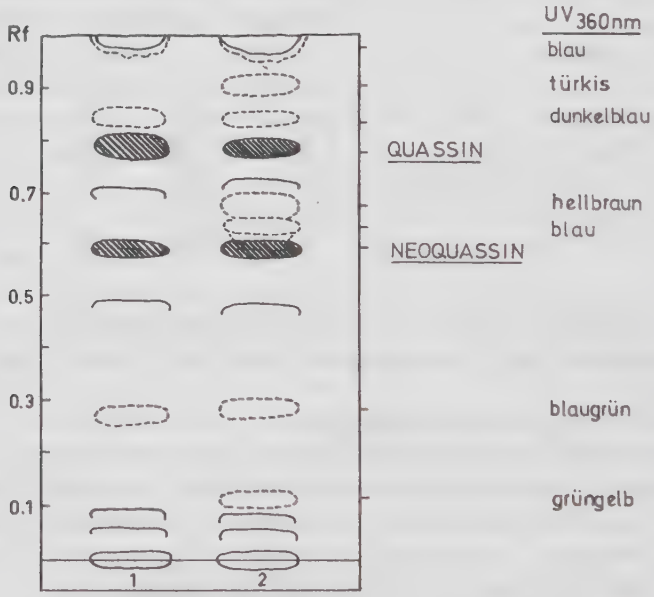


Abb. 1

DC-Unterschied: Surinam, Jamaika-Quassia

1 = Surinam-Quassia (Quassia amara)
2 = Jamaika-Quassia (Picrasma excelsa)

Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten (Merck)
Laufmittel: Chloroform-Methanol (95:5)
Detektion: 1. UV 254 nm Fluoreszenzminderung:
2. UV 360 nm Fluoreszenz:
3. Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure, (5 Min. Erhitzen bei 110°C)

Charakteristisch für die Auszüge beider Arten sind die im kurzwelligen UV erkennbaren Zonen für die Bitterstoffe Quassin (R_f 0.78) und Neoquassin (R_f 0.60). Außerdem findet man bei beiden Arten eine kräftig dunkelblau fluoreszierende Zone bei R_f 0.85, dicht über dem Quassin. Sie enthält, wie wir im späteren Verlauf der Arbeit fanden, ein Gemisch der β-Carbolin-Alkaloide Canthin-6-on und 5-Methoxy-canthin-6-on. Bei Surinam-Quassia fanden wir in Übereinstimmung mit Literaturangaben höhere Quassinkonzentrationen als bei Jamaika-Quassia. Quassin und Neoquassin färben sich nach dem Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure und 5minütigem Erhitzen bei 110°C violett an. Zusätzlich erscheinen an der Lösungsmittelfront und im R_f-Bereich bis 0.15 violett gefärbte Zonen.

Zur DC-Unterscheidung können folgende Kriterien herangezogen werden:

1. Jamaika-Quassia enthält bei R_f 0.9 eine im UV-Licht (360 nm) türkis fluoreszierende Zone, die bei Surinam-Quassia fehlt. Sie konnte später als N-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin identifiziert werden.
2. Über dem Neoquassin bei R_f 0.65 - 0.70 finden sich bei Jamaika-Quassia eine leuchtend blau fluoreszierende Zone (Scopoletin), und eine gelblich-braune Zone (Nigakinon), die ebenfalls bei Surinam-Quassia fehlen.
3. Bei R_f 0.15 - 0.20 zeigt sich auf dem Chromatogramm von Jamaika-Quassia ein grüngelb fluoreszierender Fleck, der bei Surinam-Quassia nicht erscheint.

1.2 Bisher bekannte Inhaltsstoffe von Lignum Quassiae

Bitterstoffe

Die erste Veröffentlichung über die Isolierung eines Bitterstoffes aus Lignum Quassiae stammt aus dem Jahre 1835 von WINCKLER (7). Über 100 Jahre später isolierte CLARK (8) aus dem Holz von Quassia amara zwei kristalline Bitterstoffe, die er für Isomere hielt. Einer stimmte mit dem Bitterstoff überein, den CHRISTENSEN (9) 1882 als Quassin beschrieben hatte, so daß der Name beibehalten wurde. Den zweiten Bitterstoff nannte CLARK Neoquassin. Aus Picrasma excelsa isolierte CLARK eine weitere isomere Verbindung, die mit dem von MASSUTE (10) beschriebenèn Picrasmin identisch zu sein schien. ADAMS und WHALEY (11) bewiesen 1950, daß das Picrasmin von CLARK mit dem ebenfalls von ihm beschrieben Isoquassin identisch war. "Quassin" wurde nun erstmals als Molekülkomplex aus annähernd gleichen Mengen Quassin und Neoquassin erkannt. Ein weiterer Bitterstoff, den CLARK Quassinol nannte, erwies sich mit Bisnorquassin identisch. Erst LONDON und ROBERTSON (12,13,14,15) gelang es, Quassin und Neoquassin in reinster Form zu isolieren und durch zahlreiche chemische Reaktionen zu charakterisieren.

Die Ergebnisse von LONDON und ROBERTSON lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

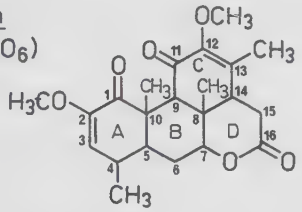
Lignum Quassiae (Surinam- und Jamaika-Quassia) enthält das γ-Lakton Quassin (I), Smp. 222°C und das entsprechende Halbacetal Neoquassin (II), Smp. 228 - 229°C, die beide nicht miteinander isomer sind. CLARK's Quassin, Picrasmin und Isoquassin waren Mischungen aus Quassin und Neoquassin. Versetzt man reinstes Quassin mit äthanolischer Salzsäure, so entsteht das isolierbare isomere Isoquassin (IV), Smp. 291°C, das nicht bitter schmeckt. Isoquassin konnte genuin in der Droge nicht nachgewiesen werden.

Auf der Basis der Ergebnisse von LONDON und ROBERTSON haben VALENTA und Mitarb. 1961 (16) durch intensive NMR-spektroskopische Untersuchungen die vorliegenden Strukturformeln

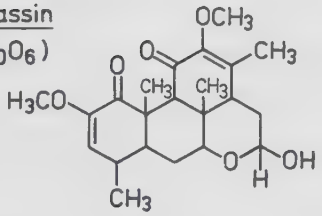
für Quassin und Neoquassin vorgeschlagen (siehe Abb. 2).

Strukturformeln der Quassia-Bitterstoffe:

I Quassin
($C_{22}H_{28}O_6$)



II Neoquassin
($C_{22}H_{30}O_6$)



III 18-OH-Quassin
($C_{22}H_{28}O_7$)

Abb. 2

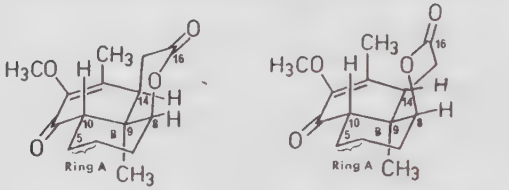
Aus im Handel erhältlichem Quassin-Gemisch (Fa.Merck) wurde von CASINOVI und Mitarb. (17) kürzlich neben Quassin, Neoquassin und Isoquassin ein weiteres Quassinoid, nämlich 18-Hydroxyquassin (III) isoliert.

Bei Quassin handelt es sich um ein Seco-Triterpenlakton. Neoquassin ist das entsprechende Halbacetal. Beiden Verbindungen gemeinsam sind je 4 Methylgruppen am C_4, C_8, C_{10} und C_{13}, sowie zwei nicht-laktonische Ketogruppen. Diese beiden Ketofunktionen

am C_1 und C_{11} sind α,β-ungesättigt. Durch Oxidation mit Silberoxid bzw. katalytische Hydrierung lassen sich Quassin und Neoquassin ineinander überführen.

VALENTA und Mitarb. (18) gelang auch die Aufklärung der Stereochemie von Quassin, Neoquassin und Isoquassin (Stereoformeln siehe Abb. 3).

Stereostruktur von Quassin und Isoquassin



Quassin (bitter) Isoquassin (nicht bitter)

Abb. 3

Quassin und Neoquassin haben an allen sieben asymmetrisch C-Atomen die gleiche Konfiguration, was auch in ihren praktisch identischen CD-Kurven zum Ausdruck kommt. Isoquassin unterscheidet sich von Quassin nur durch die Konformation des Laktonringes, der im Falle des Quassins in Sesselform, bei Isoquassin in Bootform vorliegt.

Versuche am Dreiding-Modell, sowie eine hohe Stabilität in der Konformation, die sich bei allen durchgeführten chemischen Reaktionen zeigte, lassen sich im Falle von Quassin am besten durch eine A/B Ring trans-Verknüpfung erklären. Außerdem konnte durch NMR-Studien von Quassin bzw. verschiedener seiner Reaktionsprodukte festgestellt werden, daß die beiden Methylgruppen am C_8 und C_{10} axial und cis zu den Ringen A und B liegen, während sich der Sauerstoff am C_7 in trans-Lage zur C_8-Methylgruppe befindet.

Das Proton am C_7 liegt demnach äquatorial zu Ring B. Die C_4-Methylgruppe am Ring A bildet, wie aufgrund der Kopplungskonstanten mit dem benachbarten olefinischen Proton am C_3 gezeigt werden kann, mit diesem einen Winkel von ca. 90°, was einer quasi-äquatorialen Lage zu Ring A entspricht. Aus der trans-Verknüpfung der Ringe A und B ergeben sich folgende Konsequenzen: Das H-Atom am C_5 liegt, wie die C_4-Methylgruppe, β-ständig zu Ring A, während die beiden Methylgruppen am C_8 und C_{10} α zu Ring A bzw. B angeordnet sind.

Auf die enge Verwandtschaft der Quassinoide mit den ebenfalls bitteren Limonoiden weisen die Biosynthese-Studien der Quassinoide von MORON und Mitarb. (19,20).

Demnach sind die Quassinoide biosynthetisch als abgebaute Triterpene aufzufassen. Durch Einbauversuche der Samen von Simaruba glauca (Aubl.) mit markiertem Mevalonat konnte bei den Quassinoiden experimentell der gleiche biosynthetische Vorläufer, nämlich das tetracyclische Triterpen apo-Tirucullol nachgewiesen werden, das ARIGONI und Mitarb. bei Limonin gefunden hatten (21).

Die Synthese von Quassin, ausgehend von der Cholsäure, die sowohl von der Struktur als auch von der Stereochemie eine geeignete Ausgangssubstanz zu sein scheint, wurde von DIAS und Mitarb. (22,23, 24,25) in Angriff genommen.

Nicht-bittere Inhaltsstoffe von Lignum Quassiae

Da bei der Untersuchung der Inhaltsstoffe von Quassia-Holz immer die Bitterstoffe im Mittelpunkt des Interesses standen, finden sich nur sehr wenige Hinweise auf andere Verbindungen in der Droge. Neben den Gerbstoffen Ellagsäure und Gallussäure (26) wurden die Sterine β-Sitosterin bzw. β-Sitosterol (27) gefunden. Außerdem vermuteten POLONSKY und LEDERER (28), daß es sich bei den von ROBERTSON beschriebenen gelben Kristallen (Smp. 254°C) um 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon handeln könnte, das bei den Simaroubaceen keine Seltenheit ist. MASSUTE soll 1890 (10) aus Surinam-Quassia echte Alkaloide isoliert haben (gelbe Kristalle mit blauer Fluoreszenz, in angesäuertem Alkohol löslich), die allerdings nicht

näher charakterisiert werden konnten.
Hierzu ist allerdings zu bemerken, daß nahezu alle Simaroubaceen-Arten bei Screening-Tests positive Alkaloidreaktionen geben, die jedoch in den meisten Fällen auf die in diesen Drogen enthaltenen Quassinoide zurückzuführen sind. HEGNAUER (26) gibt einen Überblick über die bisher aus Simaroubaceen isolierten Alkaloide, die dem β-Carbolin- bzw. Canthin-Typ angehören und in verschiedenen Picrasma- und Ailanthusarten gefunden wurden.

1.3 Therapeutische Anwendung und Pharmakologie

Bei den Eingeborenen des Amazonasgebietes fand die Droge, die zu den am bittersten schmeckenden des Pflanzenreichs zählt, als Amarum und Febrifugum, aber auch gegen Hautparasiten (1) und Schlangenbisse (29) Verwendung.

Nach seiner Aufnahme in europäische Pharmakopoeen im 18. Jahrhundert wurde Lign. Quassiae in Form von wässrigen Auszügen vor allem als Bitter-Tonikum, Stomachikum und Antidysenterikum geschätzt. In aus Quassia-Holz gedrechselte Becher füllte man heißes Wasser und nahm einige Zeit später die im Wasser gelösten Bitterstoffe als anregendes Stärkungsmittel zu sich (5). Die Verwendung frisch bereiteter Infuse der Droge gegen Ascariden und Oxyuren sind im BPC(1968)beschrieben. Erwähnenswert ist auch, daß, besonders in England, Quassia-Holz zum Bierbrauen als Hopfenersatz Anwendung fand. Nach einer vorklinischen Studie verhindert Quassin in einer Verdünnung von 1 : 10000 die Bewegung von Trichomonas und Endamoeba histologica, während z.B. Emetin bei gleicher Konzentration unwirksam ist (30). Die Droge regt, wie andere Bitterstoffdrogen, die Magensaftsekretion auf reflektorischem Wege an (31) und wird aber bei oraler Gabe vom Magen-Darmtrakt praktisch nicht resorbiert. Parenteral verabreicht, ist Quassin dagegen bei Säugetieren toxisch (Kaninchen: DL: 140 mg/kg). Vergiftungserscheinungen gehen mit Muskeltremor und Lähmungen der glatten Muskulatur einher (31). Von mehreren getesteten Bitterstoffdrogen wurde bei Quassia, besonders nach Vorschädigung des

Herzmuskels mit Chloroform, Chloralhydrat oder n/1000 Zyankalilösung eine sehr deutliche Herzwirkung beobachtet (32).

Quassia-Extrakte und -Zubereitungen werden außerdem als für Bienen unschädliche Insektizide bzw. Pestizide beschrieben (33,34).

Während in den neuesten Untersuchungen (Cancer Treatment Reports 8/76) bittere Verbindungen vom Quassinoid-Typ als vielversprechende Tumorinhibitoren aufgeführt wurden (35), konnte in Quassiaextrakten selbst noch keine in diesem Sinne aktive Verbindung aufgefunden werden.

2.0 Versuche zur Lokalisierung des kardiotonen Wirkprinzips

Im Jahre 1929 hatte WEGER (32) gefunden, daß wässrige Quassia-Auszüge eine kardiotone Wirkung am Herzmuskel des Frosches zeigen. Die zunächst starke Erregung der Herztätigkeit führte bei höherer Dosierung zum sofortigen systolischen Herzstillstand. Der Autor fand keine positiv chronotrope Wirkung und stellte, besonders am vorgeschädigten Herzen nach Quassia-Injektion eine Normalisierung der Herzfrequenz fest. Außerdem beschrieb er einen Synergismus zwischen Quassiaextrakt und Adrenalin.

Ausgehend von diesen Beobachtungen versuchten wir, dieses kardiotone Wirkprinzip in Quassiazubereitungen zu lokalisieren bzw. definierten Wirkstoffen der Droge zuzuordnen.

Wir zogen zur Prüfung auf Herzwirksamkeit die Versuchsanordnung von REITER (36) heran. In dieser wird die positiv inotrope Wirkung am isolierten Papillarmuskel des Meerschweinchens gemessen, indem man die isometrische Spannungsentwicklung bei jedem einzelnen Muskel mit steigenden Konzentrationen der zu testenden Substanz registriert, bis eine weitere Wirkungssteigerung nicht mehr möglich ist. Damit erhält man die maximale inotrope Wirkung beim einzelnen Muskel und kann eine Dosis-Wirkungskurve aufstellen. Aus ihr ergeben sich die Werte für die halbe maximale inotrope Wirkung (ED_{50} in Mol/l). Anhand der ED_{50}-Werte läßt sich die Wirksamkeit verschiedener Testsubstanzen untereinander vergleichen und zu den klassischen Herzglykosiden in Relation setzen.

Die Registrierung des zeitlichen Verlaufs der Dosis-Wirkungskurve gibt gleichzeitig über die Wirkungsgeschwindigkeit der einzelnen Testsubstanzen am Herzmuskel Aufschluß.

2.1 Prüfung des Quassia-Extraktes auf inotrope Wirksamkeit

Eine Voruntersuchung sollte zunächst zeigen, ob sich die von WEGER gefundene positiv inotrope Wirksamkeit des Quassia-Extraktes auch an dem weit selektiveren Testmodell des isolierten Papillarmuskels bestätigen ließ. Bereits im ersten Versuch zeigte ein frisch hergestellter Methanolextrakt aus im Handel erhältlichem Quassia-Holz (= Jamaika Quassia) in einem Konzentrationsbereich von 50 mg/50 ml Organbadlösung eine deutlich positiv inotrope Aktivität (Abb. 4). Die ED_{50}-Werte lagen in der Größenordnung von 1 x 10^{-3} Mol/L (bezogen auf ein Molekulargewicht von 400).

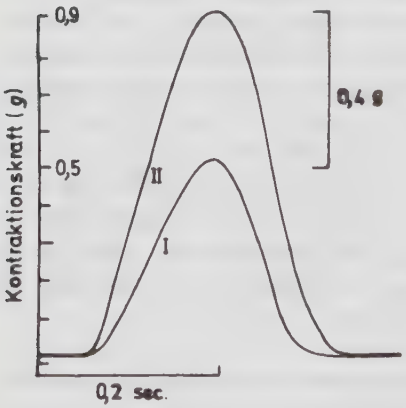


Abb. 4
Isometrische Spannungskurve des Meerschweinchen-Papillarmuskels bei Zugabe von ca. 50 mg Quassia-Extrakt (Reizfrequenz 1 Hz)

Kraftzunahme: 400 mg

I = Kontraktionskraft ohne Zusatz
II = n.Zus.von 50 mg Quassia-E.

In einem zweiten Versuch testeten wir das Quassingemisch des Handels. Es zeigte bei einer Konzentration von 20 mg/50 ml keine positiv inotrope Aktivität. Der pharmakologisch aktive Methanolextrakt wurde anschließend in einen chloroform- und wasserlöslichen Anteil aufgetrennt. Die wasserlösliche Phase war unwirksam, während die Chloroform-Ausschüttelung eine Wirksamkeit in der Größenordnung des zuvor getesteten Methanolextraktes zeigte.

Da die Bitterstoffe und die anderen bisher bekannten Inhaltsstoffe (Gerbstoffe, β-Sitosterin, 2,6-Dimethoxy-p-benzochinon)

für eine positiv inotrope Wirkung nicht in Betracht kamen, führten wir ein DC-Screening mit anschließender Fraktionierung des Drogenextraktes durch.

3.1 Dünnschichtchromatographisches Screening des Drogenextraktes

Es wurden zunächst Vorproben auf Herzglykoside, Alkaloide, Flavone, Anthrachinone, Cumarine, Fette und Sterine, ätherische Öle und Zucker durchgeführt.

Wir erhielten ein positives Ergebnis bei den Gruppenreaktionen auf Alkaloide (Dragendorff-Reagenz). Der Diisopropyläther-Auszug enthielt nach DC-Auftrennung einige Flecken, die mit Komarowsky-Reagenz (37) positiv reagierten. Dies deutete auf das Vorliegen von Sterinen und Fettsäuren. Die Wasserdampfdestillation der Droge ergab nur einen sehr geringen Gehalt an ätherischem Öl (0.015 ml/50 g Droge nach 5 Stdn.). Beim DC-Vergleich der stark fluoreszierenden Zonen (UV 360 nm) mit einigen zur Verfügung stehenden Cumarin-Testsubstanzen fanden wir Übereinstimmung mit Scopoletin. Nach Salzsäurehydrolyse des vorgereinigten Drogenextraktes und anschließendem DC-Vergleich mit einem Zuckertest-Gemisch konnte Glucose nachgewiesen werden.

Von allen positiven Gruppenreaktionen war der Nachweis von Alkaloiden am interessantesten, da aus Lignum Quassiae bisher noch keine Alkaloide isoliert worden waren.

Das Vorliegen von Alkaloiden bedurfte allerdings noch der Bestätigung durch andere Alkaloid-Nachweisverfahren, da nach FARNSWORTH (38) auch verschiedene Terpen-Laktone und Cumarine eine positive Reaktion mit Dragendorff-Reagenz geben.

3.2 Anreicherung und Überprüfung der Alkaloidfraktion

Zur Anreicherung und Überprüfung der Alkaloidfraktion wurde ein von BRÜNING (39) verbessertes Verfahren des Alkaloidscreenings nach CULVENOR und FITZGERALD (40) benützt. Sowohl bei Quassia amara als auch bei Picrasma excelsa erhielten wir

mit den Reagenzien nach VALSER, MAYER, WAGNER, SONNENSCHEIN und SCHEIBLER positive Reaktionen. Diese stammten mit Sicherheit nicht von den Quassia-Bitterstoffen oder Cumarinen, wie Vergleichsuntersuchungen ergaben. Die Alkaloidfraktionen des Surinam- und Jamaika-Extraktes zeigten im Dünnschichtchromatogramm folgendes Bild:

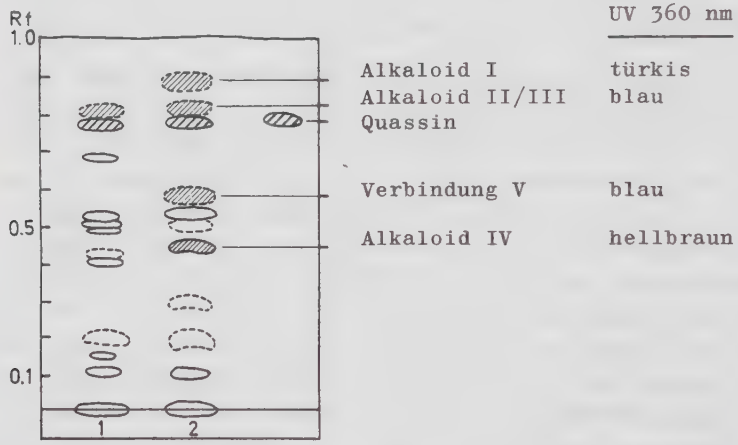


Abb. 5

DC-Bild der Alkaloidfraktionen von Surinam- und Jamaika-Quassia

1 = Surinam-Quassia
2 = Jamaika-Quassia

Adsorbens:	Kieselgel 60 F_{254}
Laufmittel:	Chloroform-Methanol (95:5)
Detektion:	1. UV 254: Fluoreszenzminderung:
	2. UV 360: Fluoreszenz:
	3. Dragendorff-Reagenz:

Wie aus der Abbildung hervorgeht, sind beim Extrakt der Jamaika-Quassia über dem Quassin-Fleck zwei Flecke erkennbar, die deutliche Alkaloidreaktionen geben. Im mittleren R_f-Bereich liegen

zwei weitere fluoreszierende Zonen mit positiver Dragendorff-Reaktion. Im Extrakt der Surinam-Quassia findet man dagegen nur eine Alkaloidzone bei R_f 0.80.

3.3 Isolierung der Alkaloide I-IV und der Verbindung V

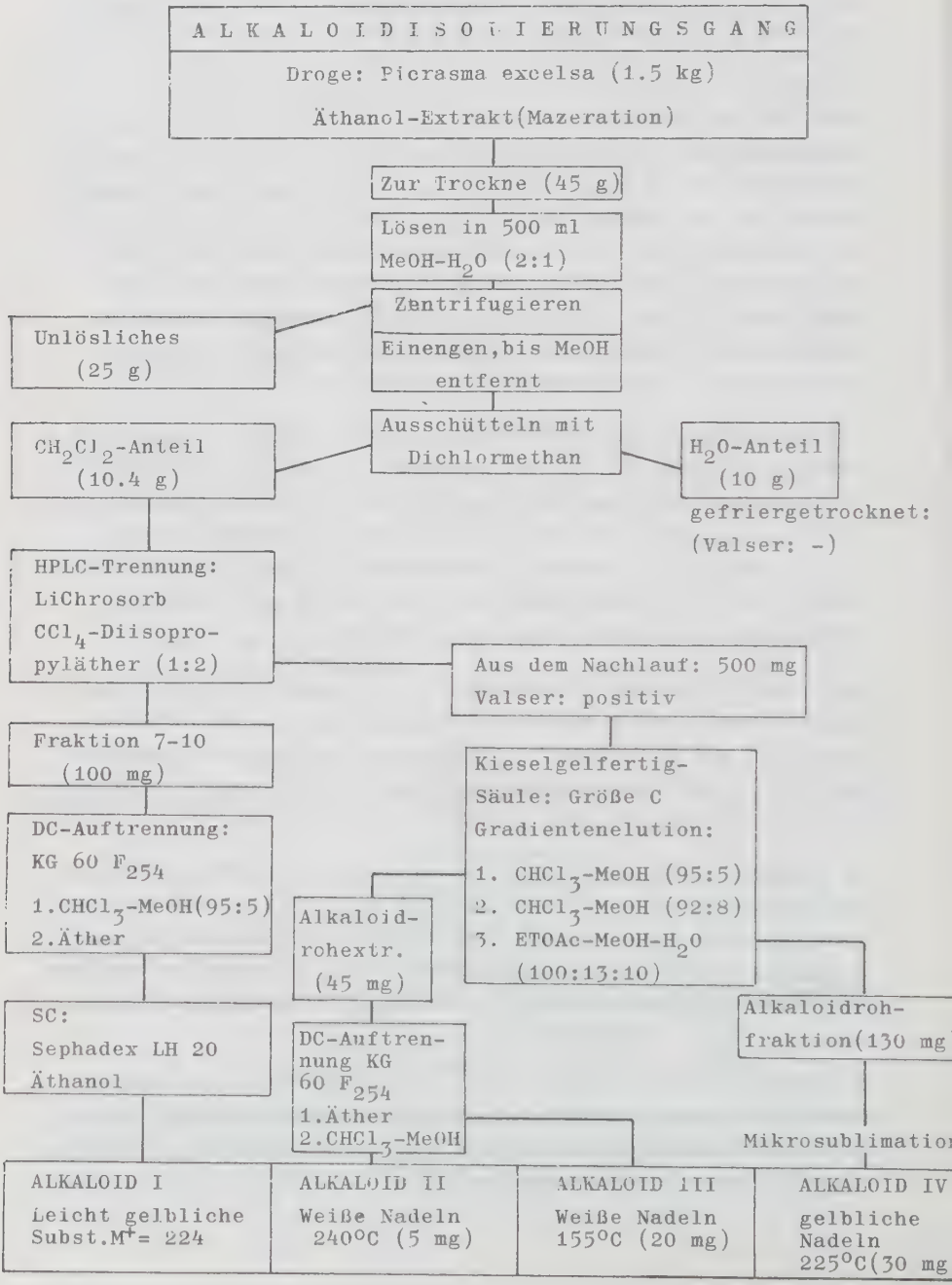
Fein gepulvertes Holz von Picrasma excelsa (Swartz) Planchon wurde nach dem Vorquellen in Wasser mit Äthanol bei Zimmertemperatur extrahiert (Mazeration). Den Mazerationsrückstand (45 g) lösten wir in einer Methanol-Wasser (2:1) Mischung und trennten gummiartige Rückstände durch Dekantieren bzw. Zentrifugieren ab. Aus der eingeengten, wässrig-methanolischen Lösung ließen sich die Alkaloide mit Dichlormethan ausschütteln. Der VALSER-Test verlief positiv.

Die Auftrennung des Dichlormethan-Anteils (10.4 g) erfolgte durch HPLC an Kieselgel (LiChrosorb) mit Hilfe zweier hintereinander geschalteter HPLC-Kartuschen (Fa.Waters, Prep.System 500) im Laufmittel Tetrachlorkohlenstoff-Diisopropyläther (1:2). Nach der UV-Absorptionsmessung bei 280 nm konnte der Rohextrakt in 14 Hauptfraktionen und einen noch Alkaloide enthaltenden Nachlauf aufgetrennt werden.

Die sehr lipophilen Fraktionen 7 - 10 enthielten eine stark angereicherte, türkisfarbene Substanzzone, die durch präparative DC auf Kieselgel in den Laufmitteln Chloroform-Methanol (95:5) und Äther weiter gereinigt werden konnte. Die Ausbeute an dieser Substanz betrug 25 mg.

Im Verlauf spektroskopischer Untersuchungen (H-NMR-, ^{13}C-NMR- und hochaufgelöster Massenspektren) zeigte sich, daß dieses Alkaloid noch durch eine 2. Verbindung mit gleichem chromatographischen Verhalten verunreinigt war. Die spätere Analyse ergab für die verunreinigende Substanz Identität mit β-Sitosterol.

Das Verhalten von β-Sitosterol, mit Indolalkaloiden schwer trennbare Anlagerungsverbindungen zu bilden, ist auch in anderen Arbeitskreisen beobachtet worden (G.A.CORDELL, Universität Illinois, pers.Mitteilung).


ALKALOIDISOLIERUNGSGANG
Droge: Picrasma excelsa (1.5 kg)
Äthanol-Extrakt(Mazeration)
Zur Trockne (45 g)
Lösen in 500 ml MeOH-H2O (2:1)
Zentrifugieren
Unlösliches (25 g)
Einengen,bis MeOH entfernt
Ausschütteln mit Dichlormethan
CH2Cl2-Anteil (10.4 g)
H2O-Anteil (10 g)
gefriergetrocknet:
(Valser: -)
HPLC-Trennung:
LiChrosorb
CCl4-Diisopro-pyläther (1:2)
Aus dem Nachlauf: 500 mg
Valser: positiv
Fraktion 7-10 (100 mg)
Kieselgelfertig-Säule: Größe C
Gradientenelution:
1. CHCl3-MeOH (95:5)
2. CHCl3-MeOH (92:8)
3. ETOAc-MeOH-H2O (100:13:10)
DC-Auftrennung:
KG 60 F254
1.CHCl3-MeOH(95:5)
2.Äther
Alkaloid-rohextr. (45 mg)
Alkaloidroh-fraktion(130 mg
SC:
Sephadex LH 20
Äthanol
DC-Auftrennung KG 60 F254
1.Äther
2.CHCl3-MeOH
Mikrosublimation
ALKALOID I
Leicht gelbliche Subst.M+= 224
ALKALOID II
Weiße Nadeln 240°C (5 mg)
ALKALOID III
Weiße Nadeln 155°C (20 mg)
ALKALOID IV
gelbliche Nadeln 225°C(30 mg

Die endgültige Reinigung gelang säulenchromatographisch an Sephadex LH 20 mit Äthanol als Elutionsmittel. Von Alkaloid I wurden insgesamt 15 mg in reiner Form erhalten. Der Schmelzpunkt der nicht kristallisierbaren Substanz lag bei ca. 150°C.

Aus dem Nachlauf der HPLC-Trennung konnten nach säulenchromatographischer Gradientenelution auf Kieselgel in den Laufmittelsystemen Chloroform-Methanol (95:5), Chloroform-Methanol (92:8) und Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13:10) zwei weitere alkaloidpositive Fraktionen erhalten werden. Aus der lipophileren Fraktion erhielten wir nach einer weiteren Auftrennung über präparative Dünnschichtplatten die Alkaloide II (5 mg, Smp. 240°C) und III (20 mg, Smp. 155°C).

Aus der hydrophileren Fraktion (Äthylacetat-Methanol-Wasser) wurden 130 mg Rohfraktion des Alkaloids IV und nach Mikrosublimation im Vakuum 30 mg kristalline Substanz vom Smp. 225°C erhalten.

Eine weitere blau fluoreszierende Substanz (= Verbindung V), die als Verunreinigung in der Rohfraktion des Alkaloids IV enthalten war und mit dem Dragendorff-Reagens eine positive Reaktion zeigte, wurde nach präparativer DC an Kieselgel mit Toluol-Äthylacetat (9:1) isoliert. Nach dem Umkristallisieren aus Äthylacetat-Äther erhielten wir Verbindung V kristallin (8 mg, Smp. 203°C).

4.0 Strukturaufklärung der Alkaloide

4.1 Alkaloid I

Aus der CHN-Analyse und dem hochaufgelösten Massenpeak der nicht kristallisierbaren Verbindung konnte das Molekulargewicht von 224,094 und damit die Summenformel $C_{14}H_{12}N_2O$ ermittelt werden. Alkaloid I zeigte keine optische Aktivität. Im UV-Spektrum (s.Abb. 7) fanden wir Maxima bei 223 nm (ε = 17200), 238 nm (ε = 17200), 275 nm (ε = 11700), 364 nm (ε = 6500). Die Lage und Intensität der Bande bei 364 nm deutete auf das Vorliegen eines oligozyklischen aromatischen Systems hin.Nach dem IR-Spektrum (s.Abb. 8, S. 19) enthielt die Verbindung keine NH-, CN- und C=O-Gruppen.

Dagegen fanden sich zwei scharfe Banden mittlerer Intensität bei 1600 bzw. 1550 cm^{-1}, die für das Vorliegen eines aromatischen bzw. olefinischen Systems sprachen. Dies wurde durch die nicht sehr scharfen "out-of-plane-Schwingungen" zwischen 800 und 650 cm^{-1} und die schwachen Aryl-H-Valenzschwingungen (Schulter bei 3040 cm^{-1}) bestätigt. Zwei relativ starke Banden bei 1400 cm^{-1} wurden als Anzeichen für Methylen- oder Methoxygruppen im Molekül gewertet.

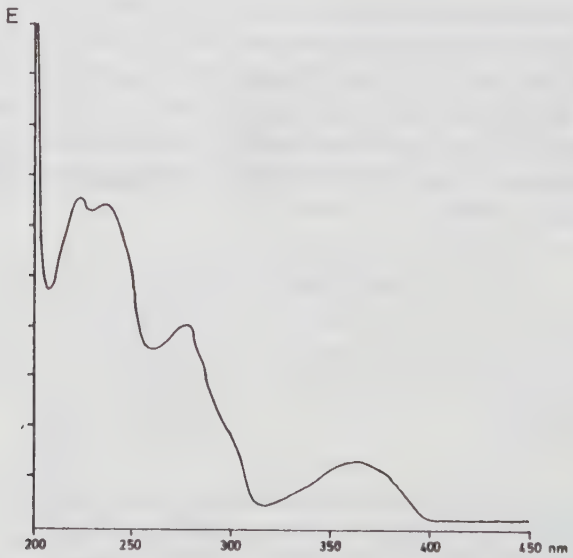


Abb. 7
UV-Spektrum: Alkaloid I (EtOH)

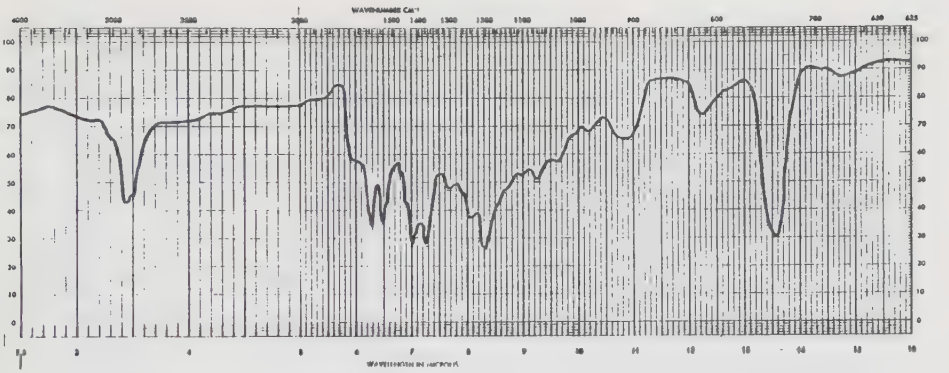


Abb. 8: IR-Spektrum Alkaloid I (KBr)

Massenspektroskopie

Im Massenspektrum (Abb. 9) erscheint der Molekülpeak (M^+ = 224) mit einer auffallend geringen Intensität von 28%. Dieses Verhalten ist für N-Heterozyklen untypisch (41) und spricht für das Vorliegen eines sehr leicht fragmentierenden Strukturelements. Auffallend ist im Spektrum ein mit großer Intensität (100%) erscheinendes Fragment bei m/e 193. Dieses konnte nur durch den Verlust einer Methoxylgruppe entstanden sein. Ein mit gleicher Massenzahl abspaltender Methylester war auf Grund des Fehlens einer C = O Valenzschwingung als Strukturelement auszuscheiden. Das Methoxyl-Fragment selbst erscheint mit einer Intensität von 63% bei m/e 31.

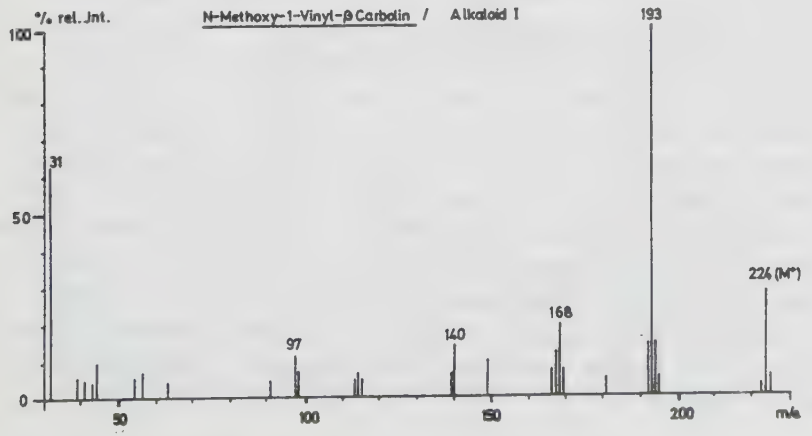


Abb. 9: Massenspektrum Alkaloid I

Im ^{13}C-Spektrum (Abb. 10, S. 21) waren die Signale für 14 C-Atome nachweisbar. Im Off-Resonance-Spektrum fanden wir zwischen 109 und 140.5 ppm 7 Dublette (tertiäre C-Atome) und ein Triplett (sekundäres C-Atom), sowie ein Quartett (quarternäres C-Atom) bei 63.5 ppm.

Nach Zusatz von Chrom-III-acetylacetonat als Relaxationsreagens (42) wurden weitere 5 quarternäre C-Atome sichtbar. Auffallenderweise lagen alle Kohlenstoffsignale bis auf eines im aromatisch-olefinischen Bereich. Dieses eine C-Atom bei 63.5 ppm mit der Multiplizität 3 mußte der schon aus dem Massenspektrum abgeleiteten Methoxygruppe zuzuordnen sein. Von den anderen Signalen fällt besonders eines bei 119 ppm auf, das unter Off-Resonance-Bedingungen zu einem Triplett aufspaltet und 2 H-Atome beinhaltet. Bei dieser chemischen Verschiebung kann es sich nur um einen terminalen Methylenkohlenstoff handeln. Von den fünf quarternären C-Atomen müssen sich drei mit Signalen bei 138.8, 130.7 und 139.8 ppm aufgrund des beobachteten downfield shifts in unmittelbarer Nachbarschaft zu einem N-Atom befinden.

Im 270-MHz-Protonen-NMR-Spektrum (Abb. 11, S. 22) fiel zunächst das für 3 Wasserstoffe integrierende Singulett bei 3.99 ppm auf, das bei dieser Lage nur von der bereits postulierten Methoxygruppe stammen konnte. Außerdem fanden wir ein AMX-System mit Signalen bei δ_A = 7.75 ppm, δ_M = 6.60 ppm und δ_X = 5.64 ppm, wodurch ein sicheres Indiz für eine Vinylgruppe als weiteres Strukturelement im Molekül gegeben war. Die Kopplungskonstanten von 5.1 Hz für zwei Dublette (AB-System) im aromatischen Bereich bei δ_A=8.47 ppm und δ_B=7.84 ppm sind charakteristisch für heteroaromatische ortho-Kopplungen. Da auch die chemische Verschiebung der Signale nach tieferem Feld für die Lage an einem Heteroaromaten spricht, läßt sich das AB-spin-System am besten zwei vicinalen Protonen in ortho-Stellung zu einem Heteroaromaten zuordnen. Die Signale der übrigen 4 noch im Molekül vorhandenen Protonen fanden wir als Multipletts ebenfalls im aromatischen Bereich. Die Kopplungskonstanten von 2 und 8 Hz zeigen, daß alle vier Protonen in Nachbarschaft zueinander liegen.

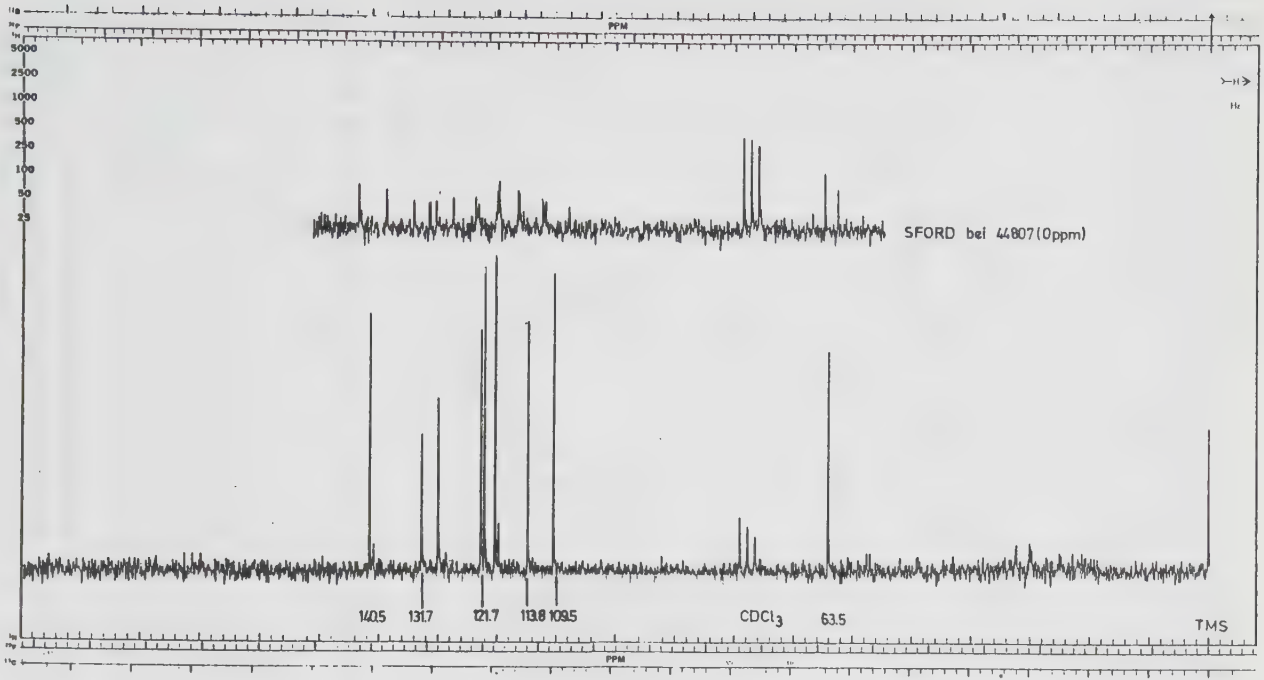


Abb. 10
^{13}C-Spektrum von Alkaloid I ($CDCl_3$;
^{1}H-breitbandentkoppelt)

Auf Grund dieser Ergebnisse können folgende Strukturelemente des unbekannten Alkaloids als gesichert gelten: Eine Methoxygruppe, eine Vinylgruppe, ein Heteroaromat mit zwei vicinalen ortho-Protonen und ein Aromat mit vier nebeneinander liegenden H-Atomen.

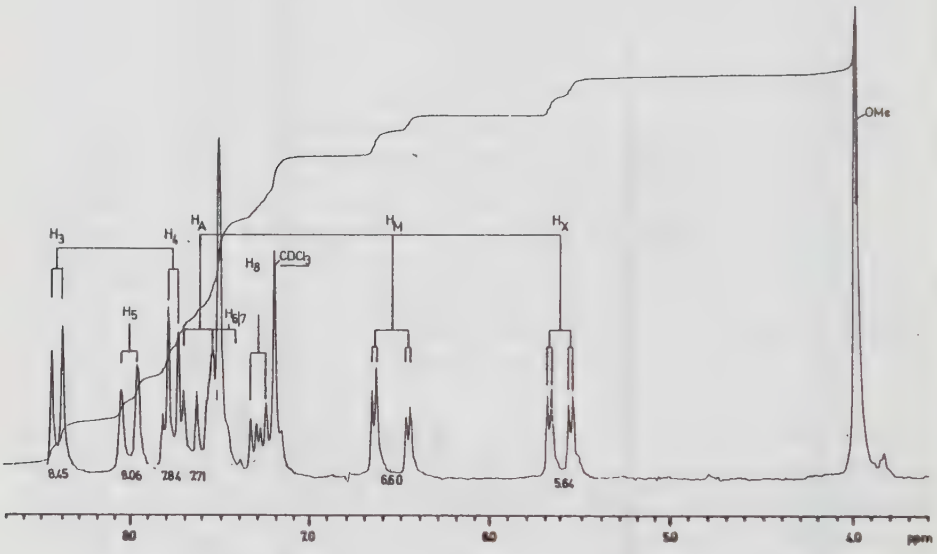


Abb. 11

270 MHz-H-NMR-Spektrum von Alkaloid I ($CDCl_3$; TMS int.)

Eine weitere wichtige Information über die Struktur des Alkaloids I gewannen wir aus der chemischen Verschiebung von drei der fünf quarternären C-Atome im ^{13}C-Spektrum. Aus dieser ging hervor, daß diese C-Atome in Nachbarschaft zu Stickstoff-Atomen liegen.

Da in der mit Quassia verwandten Art Picrasma crenata (Vell.) Engl. bereits Alkaloide vom β-Carbolin-Typ aufgefunden worden waren, lag es nahe, in unserem Alkaloid I den gleichen Grundkörper (Abb. 12)

zu vermuten. Tatsächlich waren alle spektroskopischen Daten mit diesem heterocyclischen System des β-Carbolins in guter Übereinstimmung.

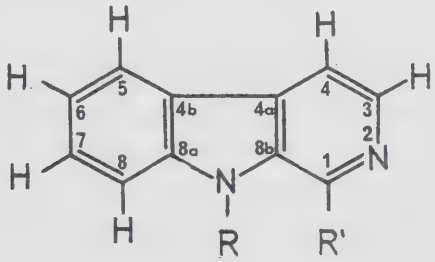


Abb. 12
Grundkörper Alkaloid I

Zu klären bliebe noch die Lage der beiden Substituenten (Vinyl- und Methoxy-Gruppe):

Nachdem die Position der beiden vicinalen Protonen am C_3 und C_4 durch ein weiteres ^{13}C-Experiment (selektive Entkopplung bei 8.50 ppm) verifiziert werden konnte, blieb für die beiden Substituenten nur noch der Indol-Stickstoff und das C_1-Atom als mögliche Verknüpfungsstelle.

Für die Lage der Vinylgruppe am C_1 spricht die chemische Verschiebung des tertiären Vinyl-C-Atoms im ^{13}C-Spektrum: Direkt an den Indol-Stickstoff gebunden müßte das Signal bei tieferem Feld erscheinen (siehe ppm-Werte der in Nachbarschaft zu Stickstoff liegenden C-Atome 8a und 1). Ein Vergleich der ^{13}C-Daten verschiedener Harman-Alkaloide (s.Tab. 2, S. 25) mit Alkaloid I zeigt, daß hier die Resonanzen der C-Atome 8a und 8b nach höherem Feld verschoben sind, was am besten mit dem β-Effekt der am Indol-Stickstoff liegenden Methoxygruppe zu erklären ist. Weitere Argumente für das Vorliegen einer N-Methoxygruppe sind die ungewöhn-

liche Lage des Methoxyl-Signales im ^{13}C-Spektrum bei 63.5 ppm (normaler Bereich für aromatische MeO-Signale 70 - 85 ppm) und die hohe Intensität des M-31-Fragmentes (100%) im Massenspektrum. Massenspektren von β-Carbolin-Alkaloiden, bei denen eine Methoxygruppe direkt am Aromaten gebunden ist, zeigen diese Fragmente nicht (43,44).

In Tabelle 3, S.26, sind die H-NMR-Daten verschiedener β-Carbolin-Alkaloide zusammengefaßt. Die von uns gefundenen Daten stimmen gut mit dem erst kürzlich isolierten Isomer-Alkaloid 4-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin aus Picrasma javanica (45) und 4,7-Dimethoxy-1-vinyl-β-carbolin aus Perriera madagascariensis (46) überein, die ebenfalls über eine Vinylgruppe am C_1 verfügen (s.Abb.14, S. 27).

Ein Proton am Indolstickstoff dieser Verbindungen führt, wie die H-NMR-Daten zeigen, zu einem verbreiterten Singulett im Bereich von 9 - 10 ppm. Da ein solches Signal in unseren H-NMR-Spektren ebensowenig gefunden werden konnte wie eine N-H-Bande im IR-Spektrum, kann die Methoxygruppe in unserer Verbindung nur an den Indol-Stickstoff gebunden sein.

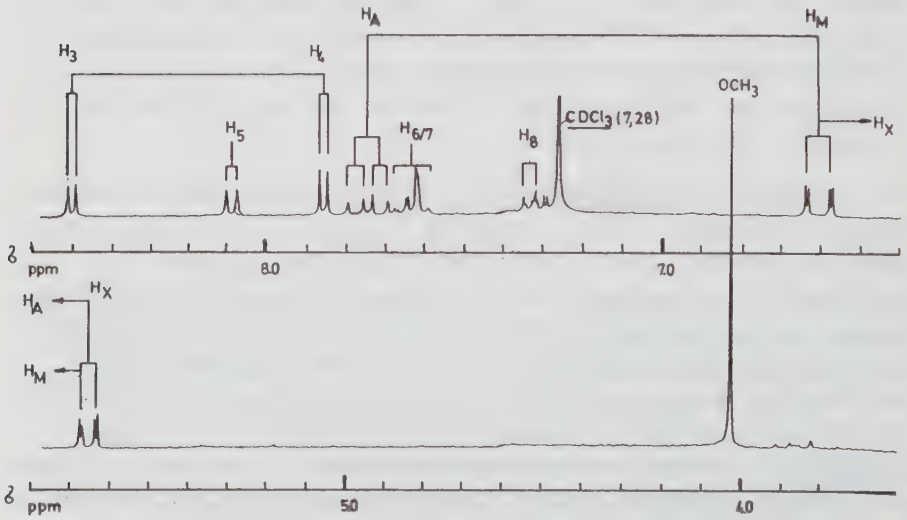
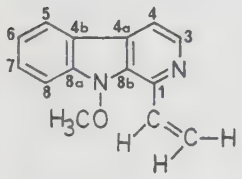


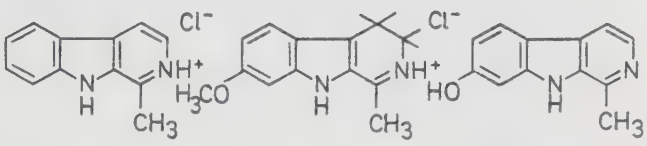
Abb. 13

Alkaloid I: 270 MHz H-NMR-Spektrum, auf 600 Hz gedehnt ($CDCl_3$; TMS int.)

Tabelle 2

^{13}C-NMR-Daten verschiedener Harman-Alkaloide im Vergleich mit Alkaloid I





	Alkaloid I		Harman-HCl		Harmin-HCl		Harmol	
C_1	139.8	s[b]	142.1	s	164.6	s	145.7	s
3	140.5	d[a]	137.3	d	41.4	t	128.3	d
4	113.8	d[a]	112.4	d	18.8	t	113.5	d
4a	118.7	s[b]	121.2	s	118.6	s		
4b	127.6	s[b]	127.2	s	125.3	s	112.7	s
5	121.7	d[a]	121.3	d	122.4	d	124.4	d
6	128.9	d	127.6	d	113.9	d	112.8	d
7	121.1	d	119.1	d	160.7	s	161.4	s
8	109.5	d[a]	111.9	d	93.9	d	96.7	d
8a	138.8	s[b]	140.6	s	142.8	s	133.5	s
8b	130.7	s[b]	134.7	s	124.2	s	132.2	s
C_1-R	131.7	d	20.3	q	18.3	q		
	119.3	t						
O-CH_3	63.5	q			55.3	q		

Die chemischen Verschiebungen sind auf TMS(int.) bezogen. Lösungsmittel $CDCl_3$; Temperatur 56°C; Frequenz 25.2 MHz.

a) Zuordnung durch selektive Entkopplung bestätigt.

b) Die Signale dieser quarternären C-Atome waren von extrem geringer Intensität und konnten erst nach Zugabe des Relaxationsreagenzes Chromacetylacetonat (42) ausgewertet werden.

Tabelle 3

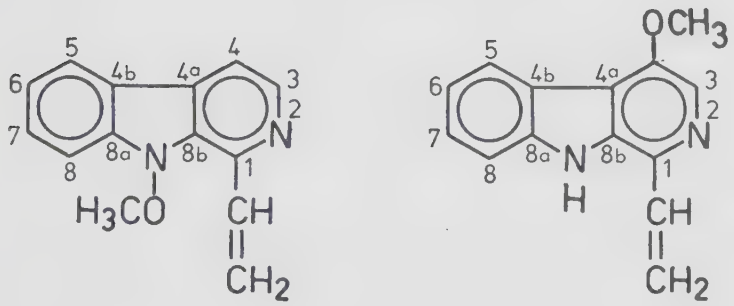
H-NMR-Daten verschiedener β-Carbolin-Alkaloide im Vergleich mit Alkaloid I

Verbindung	N-H	H-3	H-4	H-5	H-6,7(8)		$-C_2-H_5$	-C=C	Ref.
1-Äthyl-β-carbolin	9.97 s breit	8.45 d J= 5.0	7.80 d J= 5.0	8.10 d J= 7	7.1-7.6 m		3.19 q 1.45 t J=7	-	(43)
8-Methoxy-1-äthyl-β-carbolin	8.83 s breit	8.36 d J= 5	7.90 d J= 5	7.77 d J= 7	6.9-7.6 m	4.0 s	3.13 q 1.45 t J=7	-	(43)
4-Methoxy-1-äthyl-β-carbolin (Crenatin)	9.90 s breit	8.00 s	-	8.37 d J= 7	7.1-7.5 m	4.10 s	3.13 q 1.40 t J=7	-	(43)
4,8-Dimethoxy-1-äthyl-β-carbolin (Crenatidin)	8.90 s breit	8.00 s	-	7.90 d J= 7	6.8-7.3 m	4.07 s 3.90 s	3.07 q 1.40 t J=7	-	(43)
4-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin	10.8 s breit	8.15 s	-	8.34 q $J_{5,6}=8$ $J_{5,7}=1.5$	7.2-7.5 m	4.08 s	-	A=5.5;J_{AX}=11 M=6.2;J_{AM}=17.5 X=7.1;J_{MX}=1.5	(45)
4,7-Dimethoxy-1-vinyl-β-carbolin	9.40 s breit	8.00 s	-	8.20 d J= 9.5	6.6-7.0 m	4.08 s 3.80 s	-	A=5.5;J_{AX}=11 M=6.2;J_{AM}=17.1 X=7.1;J_{MX}=1.5	(46)
N-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin (Alkaloid I)	-	8.47 d J= 5.1	7.84 d J= 5.1	8.08 d J= 7	7.3-7.6 m	3.99 s (N-OMe)		A=7.7;J_{AX}=10.6 M=6.6;J_{AM}=17.0 X=5.6;J_{MX}=2.1	

Alle Kopplungskonstanten (J) in Hz; Chem.Verschiebungen in ppm (bezogen auf TMS (int.))

Wir schlagen daher für Alkaloid I die in Abb. 14 gezeigte Struktur vor.

Ein Indolalkaloid mit einer N-Methoxy-Gruppe ist bisher nur in Gelsedin, aus Gelsemium sempervirens L. gefunden worden (47).



I II

Abb. 14

I = N-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin (Alkaloid I)

II = 4-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin (isomeres Alkaloid aus Picrasma javanica)

4.2 Alkaloid II und III

Alkaloid II (Smp. 240°C) kristallisierte in feinen weißen Nadeln (5 mg). Der Schmelzpunkt des ebenfalls in weißen Nadeln kristallisierenden Alkaloids III betrug 157°C. Beide Alkaloide zeigten bei der DC im Laufmittel Chloroform-Methanol (95:5) gleiches chromatographisches Verhalten (R_f 0.85) und bei der Detektion die gleiche leuchtend blaue Fluoreszenz im UV-Licht. Aus der CHN-Analyse und dem Massenspektrum konnten wir für Alkaloid II die Bruttoformel $C_{15}H_{10}N_2O_2$ (MG 250,074) ermitteln. Bei Alkaloid III berechneten wir als Summenformel $C_{14}H_8N_2O$ (MG 220,063). Beide Alkaloide waren optisch nicht aktiv und verfügten über 12 Doppelbindungsäquivalente.

Im UV-Spektrum (s.Abb. 15) fielen uns sowohl bei Alkaloid II als auch bei Alkaloid III zwei starke Banden zwischen 350 und 380 nm auf, die auf das Vorliegen eines polycyclischen aromatischen Systems schließen lassen.

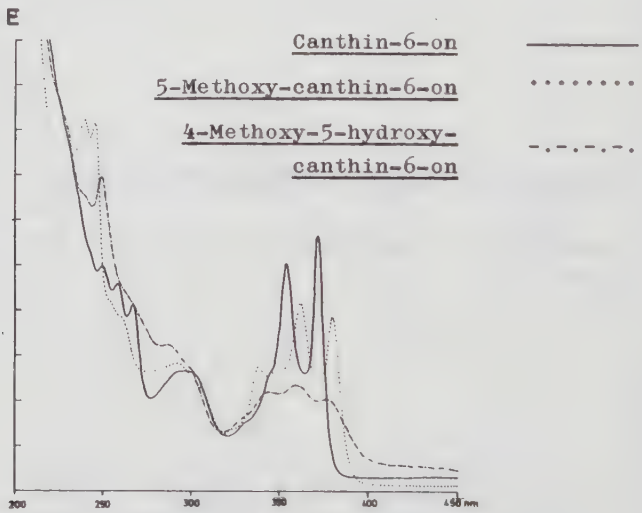


Abb. 15
UV-Spektrum der Alkaloide II - IV (in EtOH)

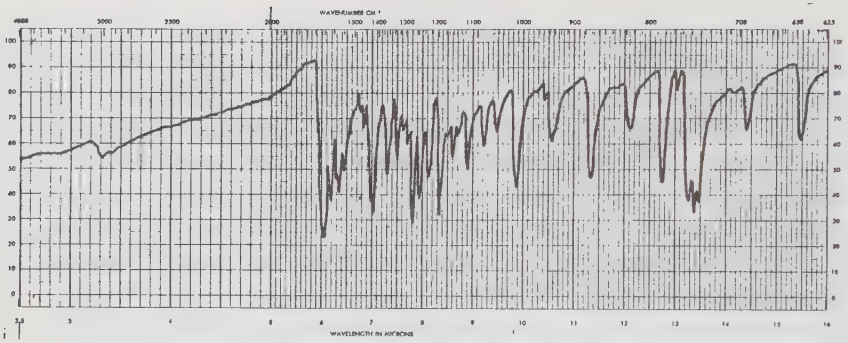
Im IR-Spektrum (Abb. 16, S. 30) fanden wir bei beiden Alkaloiden, abgesehen von schwachen Aryl-H-Valenzschwingungen bei 3000 cm^{-1} keine Absorption zwischen 2000 und 3000 cm^{-1}, wodurch NH- bzw. OH-Gruppen als Strukturelemente ausscheiden. Alkaloid II und III unterschieden sich durch die Lage der Carbonylbanden, die jeweils auf eine Carbonylgruppe in Konjugation zu einer Doppelbindung schließen ließen.(Alkaloid II 1670 und 1630 cm^{-1}; Alkaloid III 1650 und 1600 cm^{-1}).

Beide Alkaloide zeigten Aromaten-Schwingungen (Banden mittlerer Intensität zwischen 1550 und 1580 cm^{-1}). Die Substitutionsmuster der Aromaten (Banden bei 750 cm^{-1}) waren nicht identisch.

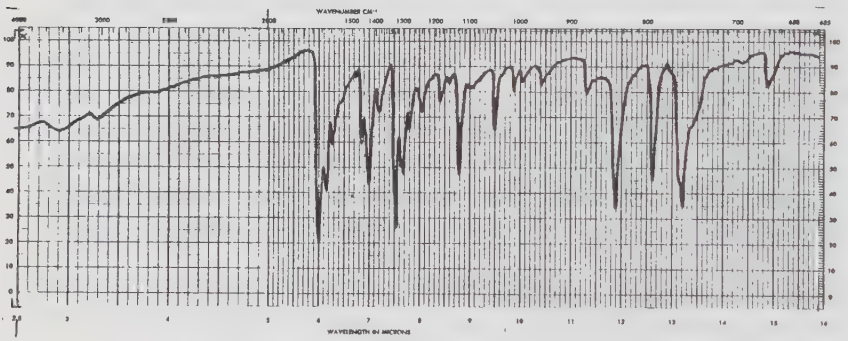
Im Massenspektrum (Abb. 17, S.32) (Alkaloid II M^+ = 250; Alkaloid III M^+ = 220) verlief die Fragmentierung, abgesehen von einem gemeinsamen Bruchstück (m/e 192) auf verschiedene Weise. Die Abspaltung von 28 Masseneinheiten bei Alkaloid III war typisch für ungesättigte cyclische Ketone und stand im Einklang mit der im IR-Spektrum postulierten konjugierten C = O-Gruppierung.

Aufgrund der geringen Substanzmenge, in der Alkaloid II vorlag, wurde ein 60 MHz-H-NMR-Spektrum (Abb. 18, S. 33) nur von Alkaloid III angefertigt.
Wir fanden ausschließlich im aromatischen ppm-Bereich die Signale für 8 Protonen.

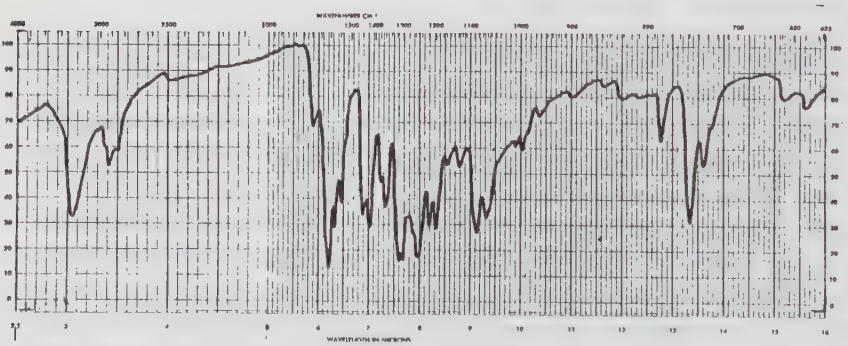
Ein A B-spin-System zweier Dublette bei δ_A=7.82 und δ_B=8.73 ppm, deren Kopplungskonstanten 5.5 Hz betrug, brachte, wie schon im Falle von Alkaloid I, Hinweise auf das Vorliegen einer heteroaromatischen ortho-Kopplung. Die Kopplungskonstante von 10 Hz, die wir bei einem weiteren AB-spin-System im aromatischen Verschiebungsbereich des Spektrums ermittelten, ließ darauf schließen, daß diese beiden Protonen nicht direkt an einen Aromaten gebunden waren, sondern sich an einer Doppelbindung in Konjugation zu einem Aromaten befanden. Die Signale der vier noch fehlenden Protonen waren in zwei Quartette (7.97 ppm, 8.54 ppm) bzw. zwei Multiplette (6.89 ppm, 7.61 ppm) aufgespalten. Aus den Kopplungskonstanten von 2 und 8 Hz war zu schließen, daß diese 4 H-Atome in Nachbarschaft an einem aromatischen Ring liegen mußten.



Alkaloid II



Alkaloid III



Alkaloid IV

Abb. 16
IR-Spektren der Alkaloide II - IV (KBr)

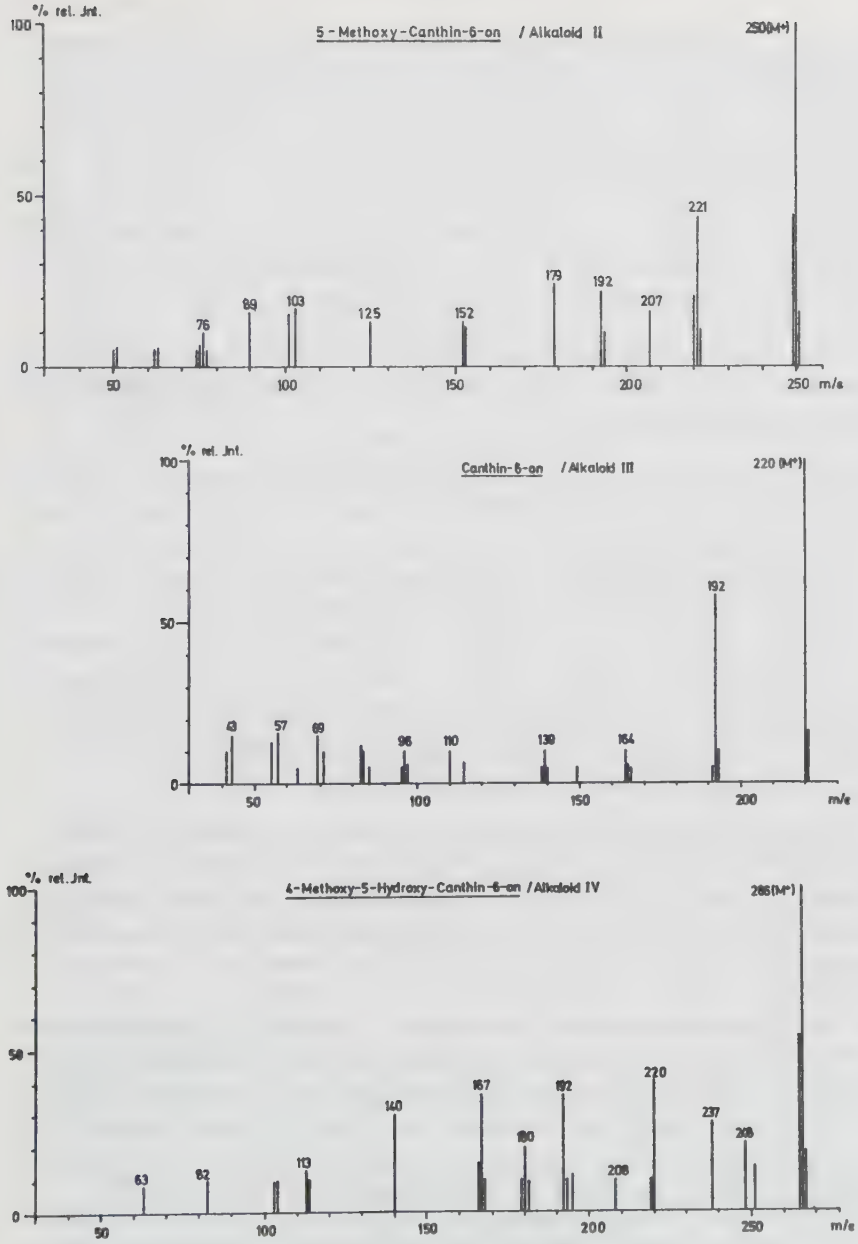


Abb. 17

Massenspektren der Alkaloide II - IV

Aufgrund des NMR-Spektrums konnte es sich bei Alkaloid III nur um eine Verbindung mit β-Carbolin-Grundgerüst handeln. Dieses Grundgerüst mußte allerdings durch eine Carbonylgruppe (siehe IR-Spektrum) und eine in Konjugation zu einem Aromaten stehende C = C-Bindung (siehe H-NMR-Spektrum) erweitert werden.

Da keine NH-Gruppe im Molekül zu sehen war (siehe IR- bzw. NMR-Spektrum), vermuteten wir, daß es sich bei Alkaloid III um eine Verbindung vom Canthinon-Typ handeln könnte.

Ein Vergleich mit Literaturdaten bzw. authentischen Mustern *) verschiedener Canthinone ergab im Falle von Alkaloid III Übereinstimmung mit Canthin-6-on.

Bei Alkaloid II mußte es sich aufgrund der weitgehenden Übereinstimmung mit Alkaloid III in den UV- und IR-Spektren um ein Molekül mit gleichen funktionellen Gruppen, also ebenfalls um ein Canthin-Alkaloid handeln. Wie aus der Summenformel und dem Massenspektrum zu ersehen war, verfügte Alkaloid II über eine zusätzliche Methoxygruppe. Das Studium von Literaturdaten verschiedener Methoxy-Canthinone ergab eine Übereinstimmung der ermittelten chemisch-physikalischen Daten mit 5-Methoxy-canthin-6-on. Dies konnte durch Spektrenvergleich und dem Mischschmelzpunkt mit einem authentischen Vergleichsmuster bestätigt werden.

5-Methoxy-canthin-6-on (Alkaloid II) wurde erstmals von NELSON und PRICE (48) in Pentaceras australis Hook, einer Rutaceen-Art, beschrieben und ist seither in zwei weiteren Rutaceen, nämlich Zanthoxylum elephantiasis (49) und Zanthoxylum caribaeum Lam.(50) gefunden worden.

Die enge chemotaxonomische Beziehung zwischen der Simaroubaceen- und Rutaceen-Familie zeigte sich auch im Falle von Canthin-6-on (Alkaloid III), das nach seiner Entdeckung in Pentaceras australis Hook (Rutaceae) (51) kürzlich auch aus Picrasma crenata (Vell.) Engl. (52) und Ailanthus altissima Swingle (53), beides Simaroubaceen-Arten, isoliert werden konnte.

*) Wir danken Herrn Professor Dr.J.L.Beal, Univ.Columbus, Ohio, für authentische Muster verschiedener Canthin-Alkaloide.

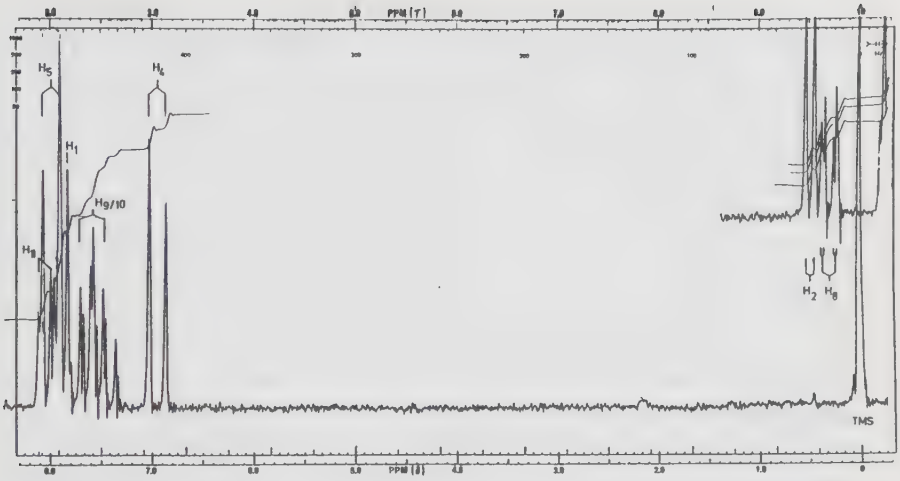


Abb. 18

60 MHz H-NMR-Spektrum von Alkaloid III (Canthin-6-on)

4.3 Alkaloid IV

Alkaloid IV bestand aus gelblichen Nadeln, die unter dunkler Verfärbung bei 225°C schmolzen. Bei ca. 190°C begann die Substanz zu sublimieren. Aus der CHN-Analyse und dem Massenspektrum (M^+ = 266) berechneten wir eine Bruttoformel von $C_{15}H_{10}N_2O_3$ (MG 266.069). Daraus ergaben sich wie bei Alkaloid II und III 12 Doppelbindungsäquivalente. Das unbekannte Alkaloid zeigte keine optische Aktivität. Wie aus dem DC-Verhalten im Vergleich zu den bisher isolierten Alkaloiden abzulesen war (s.Kap.10.2,S.94), handelte es sich bei Alkaloid IV um eine Verbindung mit höherer Polarität.

Im UV-Spektrum (Abb. 15, S. 28) war die Absorption zwischen 350 und 380 nm nicht so stark ausgeprägt, wie bei den bisher isolierten Alkaloiden.

Das IR-Spektrum zeigte, abgesehen von OH- oder NH-Valenzschwingungen bei 3300 nm große Ähnlichkeiten mit den Alkaloiden II und III (Carbonylbanden, Aromatenschwingungen).

Die Acetylierung der Verbindung führte, wie aus dem Massenspektrum (M^+ 308) zu ersehen war, zu einem Monoacetat (Abspaltung von 42 Masseneinheiten). Im 60 MHz-H-Spektrum erschien bei der acetylierten Verbindung das Signal für die Acetoxygruppe bei 2.50 ppm (Singulett, 3 H). Damit konnte das Vorliegen einer OH-Gruppe in Alkaloid IV als gesichert angesehen werden. Im NMR-Spektrum des nicht acetylierten Alkaloids (Abb. 19, s.u.) fanden wir nach Austausch der Hydroxylprotone eine Methoxygruppe als weiteren Substituenten (Singulett 4.27 ppm, 3 H). Die Lage der übrigen Signale (AB-spin-System δ_A=8.74, δ_B=8.02; J_{AB} = 5.1 Hz und Multiplett bei δ=7.37 - 8.50 ppm, 4 aromatische H) zeigten, daß Alkaloid IV ebenfalls ein Canthin-Grundskelett hatte. Da die Positionen am C_1 und C_2 (AB-spin-System) und am C_8 bis C_{11} (Multiplett, 4 H), wie aus dem NMR-Spektrum ersichtlich, besetzt waren, kamen für die Lage der Methoxy- bzw. Hydroxygruppe nur noch die C-Atome 4 und 5 (siehe Abb. 20, S. 35) in Frage. Die ermittelten Schmelzintervalle von Alkaloid IV (225°C) und seinem Monoacetat (191°C) stimmten, ebenso wie die anderen chem.physikalischen Daten (IR, UV, NMR, Masse) mit denen des kürzlich aus Picrasma ailanthoides Planchon (54) isolierten 4-Methoxy-5-hydroxy-canthin-6-ons (= Nigakinon) überein.

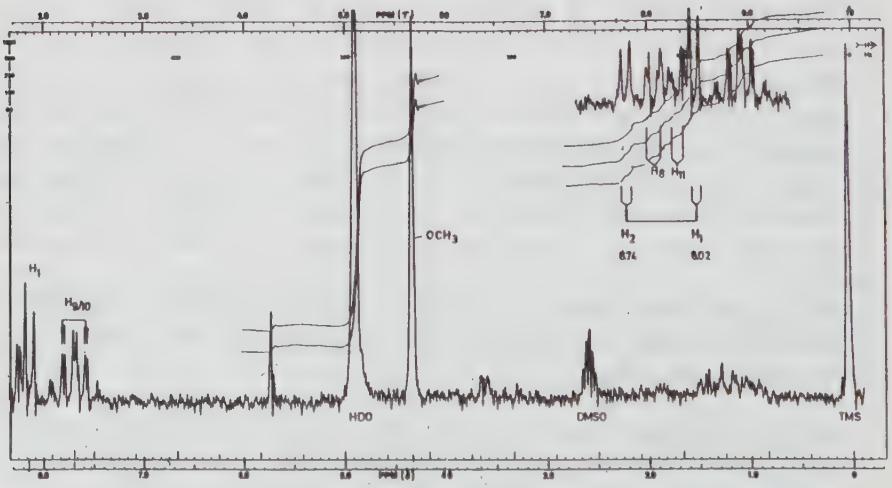


Abb. 19
60 MHz H-NMR-Spektrum von Alkaloid IV

Alkaloid II: R_1 = H; R_2 = OMe;
(5-Methoxy-canthin-6-on)

Alkaloid III: R_1 = R_2 = H;
(Canthin-6-on)

Alkaloid IV: R_1 = OMe; R_2 = OH;
(4-Methoxy-5-hydroxy-canthin-6-on)

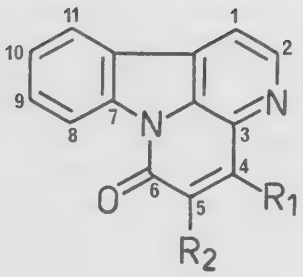


Abb. 20
Strukturformeln der Alkaloide II, III und IV

4.4 Verbindung V

Verbindung V (Smp. 203°C) kristallisierte in feinen weißlichen Nadeln (8 mg). Die CHN-Analyse ergab keinen Hinweis auf Stickstoff im Molekül. Als Summenformel berechneten wir $C_{10}H_8O_4$ (MG 192.042). Die im UV-Licht leuchtend blau fluoreszierende Verbindung hatte beim DC-Screening eine positive Nachweisreaktion auf Cumarine gezeigt und sich in verschiedenen Laufmitteln wie die Testsubstanz Scopoletin verhalten (s.Kap. 3.1, S. 13).

Das UV-Spektrum mit Maxima bei 230 nm, 255 nm, 300 nm, 348 nm und 390 nm und einer Inflexion bei 260 nm stand mit den in der Literatur gegebenen Daten (55) für 6-Methoxy-7-hydroxy-cumarin (= Scopoletin) im Einklang. Die Identität der isolierten Verbindung V mit Scopoletin konnte durch den unveränderten Mischschmelzpunkt und ein Überlagerungsspektrum mit authentischem Scopoletin bestätigt werden.

5.0 Zusammenfassung der pharmakologischen Testergebnisse

Nach den Voruntersuchungen (Kap. 2.1, S. 12) sollte sich das positiv inotrope Wirkprinzip in der alkaloid-haltigen Chloroform-Fraktion des Drogenextraktes befinden. Nach der säulenchromatographischen Auftrennung des Alkaloidrohextraktes an Kieselgel im Laufmittel Chloroform-Methanol (99:1) (Abb. 21, S. 37) erwiesen sich die Fraktionen des oberen und mittleren R_f-Bereichs (0.55 - 0.90 und 0.30 - 0.55) als positiv inotrop wirksam, während bei Fraktionen des unteren R_f-Bereichs keine oder negativ inotrope Aktivität gefunden wurde.

Aus den pharmakologisch aktiven Fraktionen wurden vier β-Carbolin-Alkaloide und Scopoletin (Kap. 3.3, S. 15) isoliert. β-Carbolin-Alkaloide vom Typ des Harmins und Harmalins sind als reversible Monoaminoxydase (MAO)-Hemmstoffe bekannt (56). Sie zeigen hypotensive und zentralerregende Wirkung. Wegen ihrer psychomotorischen Wirkung zählen sie zu den Halluzinogenen. Über die cardiovaskuläre Wirkung der Harman-Alkaloide gibt es widersprüchliche Angaben. Während AARONS und Mitarb. (57) über eine signifikante Erhöhung der myocardialen Kontraktion bei Harmin, Harmalin und Harmalol berichten, fanden GERSHON und LANG (58) einen negativ inotropen Effekt.

Alle isolierten Alkaloide wurden daher von uns am Papillarmuskel auf positive inotrope Wirkung untersucht. In einem Konzentrationsbereich von 10 mg/50 ml zeigte aber keines der vier Alkaloide eine positive Wirkung. Alkaloid IV war sogar negativ inotrop wirksam. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von WEGER (32), daß die positiv inotrope Wirkung des Quassia-Mazerates immer von einer kurzen negativ inotropen Phase überlagert ist. Scopoletin war ebenfalls unwirksam. Damit bleibt das herzwirksame Prinzip der Droge noch ungeklärt. Der Extrakt muß demnach noch weitere bisher chromatographisch nicht nachweisbare Verbindungen enthalten oder das wirksame

Prinzip ist thermo- und photoinstabil und wurde bei der Aufarbeitung zerstört. Für die zweite Erklärung spricht, daß die Wirksamkeit der von uns getesteten positiv inotropen Rohfraktionen nach zweimonatiger Lagerung signifikant abgenommen hatte. Bereits WEGER (32) hatte nur Kaltwasser-Mazerate als wirksam befunden.

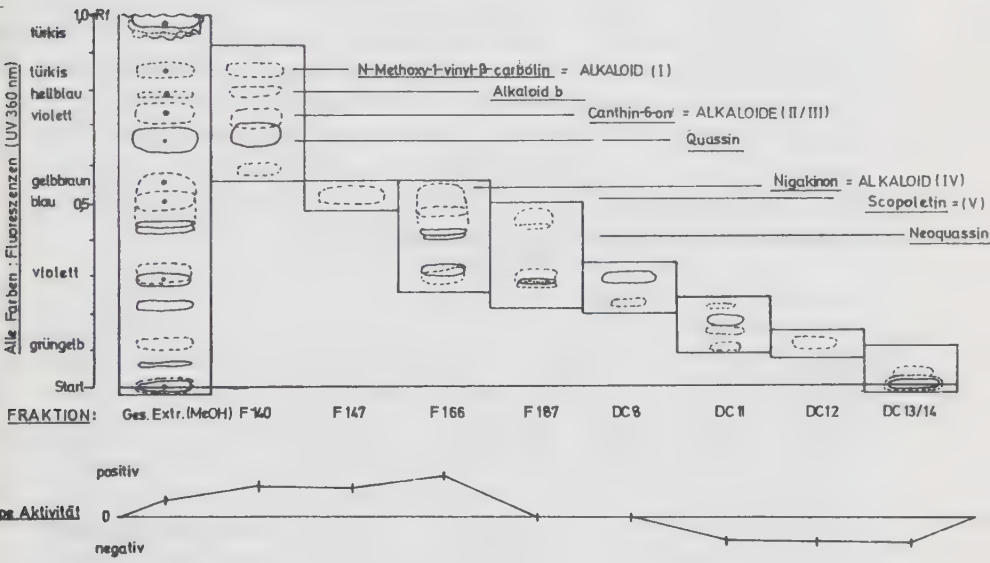


Abb. 21

DC-Übersicht über die auf positiv inotrope Aktivität getesteten Fraktionen und Reinsubstanzen aus Extr.Quassiae (MeOH)

Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254} (Merck)
Laufmittel: $CHCl_3$-MeOH (95:5)
Detektion: UV 254 nm ——
UV 360 nm ·····
Dragendorff-Reagenz: •

6.0 Quantitative Bitterstoffbestimmung

6.1 Bisherige analytische Untersuchungsmethoden der Arzneibücher

Die Quassia-Droge gehört zu den Bitterstoffdrogen mit dem höchsten Bitterstoffgehalt. Soweit bis heute bekannt, beruhen die beschriebenen pharmakologischen Wirkungen der Droge (siehe dazu Kap. 1.3, S. 10) ganz oder zum größten Teil auf dem Gehalt an den Bitterstoffen Quassin und Neoquassin. Durch Überdosierung kann es zu Magenreizungen, Erbrechen und Muskelkrämpfen (3,31) kommen. Der im Handel befindliche Bitterstoff Quassin (zu 95% aus Quassin und Neoquassin bestehend) gehört in die Gruppe der vorsichtig aufzubewahrenden Substanzen (59,60). Die maximale Einzeldosis wird mit 4 mg, die Tageshöchstdosis mit 12 mg angegeben (59).

Geht man von einem Durchschnittsbitterstoffgehalt von 0.1% in der Droge aus, wird die Tageshöchstdosis bereits mit 12 g Droge erreicht. Bei den von uns gefundenen Bitterstoffgehalten (bis zu 0.3%) dürften täglich höchstens 4 g Droge eingenommen werden. In den Arzneibüchern wird zwar eine Einzeldosis von 500 mg empfohlen, doch findet man bisher keine exakte Gehaltsbestimmung für die Quassinoide der Droge. Die Analytik beschränkt sich in allen in Tab. 1, S. 3 aufgeführten Pharmakopoeen auf die Überprüfung der Identität und Reinheit der Droge (61). Diese erfolgt durch die Ermittlung des Aschegehaltes, des Gehaltes an wasserlöslichen Extraktivstoffen, sowie den Ausschluß fremder Beimengungen (Geforderte Werte: siehe Tab. 4, S. 39).

Eine Bitterwert-Bestimmung fordern nur der British Pharmaceutical Codex (1968) (62) und die Pharmacopoea Danica IX (1948) (63). Es werden aber weder eine Grenzwert-, noch eine absolute Bitterwert-Bestimmung durchgeführt. Durch eine sensorische Prüfung soll lediglich Drogenmaterial ausgeschlossen werden, aus dem die Bitterstoffe ganz oder teilweise extrahiert wurden.

T a b e l l e 4

Arzneibuchforderungen für Lignum Quassiae (Auszug)

Stammpflanze	Asche-gehalt (max.) %	Andere Forderungen	Pharmakopoe
Quassia amara	3	Säureunlösl.Asche max. 1.5%	Dan.IX
	4	-	Helv.V,Hisp.IX, Norv.V
	6	-	Svec.XI
Picrasma exc.	5	Säureunlösl.Asche max. 0.1%	Dan.IX
	5	Wasserlösl.Extrakt-stoffe mind. 4% Fremde Beimengung. max. 2%	BPC 68, BP 53
	8	-	Ned.VI,Helv.V, Hisp.IX,Norv.V, Ital.VI,Fenn 37

6.2 Aufgabenstellung

Da die bisherigen analytischen Untersuchungsmethoden den heutigen Anforderungen der Drogen-Analytik nicht mehr genügen, sollte eine exakte Gehaltsbestimmung für die Bitterstoffe der Quassia-Droge ausgearbeitet werden.

Die mit relativ einfachen Mitteln durchführbare sensorische Gehaltsbestimmung ist schlecht reproduzierbar und besitzt eine Reihe von erheblichen Mängeln. Eine statistisch abgesicherte Gehaltsbestimmung erfordert objektive Meßkriterien, die nur mit Hilfe von chemisch-physikalischen Methoden erhalten werden können. Ein erster Versuch in dieser Richtung wurde erst kürzlich mit Erfolg von WAGNER und MÜNZING bei der Enzian-Droge durchgeführt (64). Hauptziel war auch hier, eine chemische Gehaltsbestimmungsmethode zu entwickeln, die mit

dem Bitterwert der Droge korrelierbar war.

Voraussetzung für eine chemische Gehaltsbestimmung ist die Kenntnis aller in der Droge vorhandenen Bitterstoffe. Außerdem müssen alle Bitterstoffe zur Aufstellung von Eichgeraden in reiner Form zur Verfügung stehen.

6.3 Isolierung der Bitterstoffe

Vorschriften zur Isolierung von Bitterstoffen aus Quassia finden sich bei CLARK (8), ADAMS und WHALEY (11), sowie LONDON et al. (12) und HANSEN et al. (14).

Wir haben die dort angegebenen Verfahren im chromatographischen Teil etwas verbessert und auf relativ einfache Weise die Bitterstoffe Quassin und Neoquassin in guten Ausbeuten rein isoliert.

Der konzentrierte Methanolextrakt der Droge wurde zunächst durch Dekantieren vom teerigen Anteil befreit. Anschließend verdünnten wir die Lösung mit Wasser, bis zu einem Methanolgehalt von ca. 40% und filtrierten die entstandene harzige Fällung ab. Die wässrig-methanolische Lösung wurde mit 10%iger Natronlauge alkalisiert und nach Zusatz von Wasser mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Beim Sättigen der wässrig-alkalischen Lösung mit CO_2 fiel Quassin aus, während sich Neoquassin in der Dichlormethan-Phase anreicherte. Die Reinigung des Quassins und Neoquassins gelingt am besten durch Säulenchromatographie oder präparative Dünnschichtchromatographie an Kieselgel mit $CHCl_3$-MeOH-(98:2), bzw. $CHCl_3$-MeOH (95:5) als Elutions- bzw. Laufmittel.

Die Ausbeuten an Quassin und Neoquassin betrugen ca. 0.1% bezogen auf die getrocknete Droge. Quassin und Neoquassin kristallisieren aus Methanol-Wasser-Mischungen.

Physikal.chem.Daten siehe Kap. 6.4, S. 43

Isolierung und Darstellung der Bitterstoffe aus dem Quassin-Gemisch des Handels

Die für die Analytik notwendigen Mengen an reinstem Quassin und Neoquassin isolierten wir aus dem Handels-Quassin der Fa.Roth, Karlsruhe, durch präparative DC, Säulenchromatographie, oder mit Hilfe der kürzlich von TITTEL (65) ausgearbeiteten HPLC-Trennung. Allen drei Methoden gemeinsam ist die Verwendung von Kieselgel als stationäre Phase, während als mobile Phase Mischungen von Chloroform-Methanol bzw. Dichlormethan-Methanol zur Anwendung kamen.

Die Detektion erfolgte aufgrund der Fluoreszenzminderung aller Substanzen im kurzwelligen UV bei 254 nm. Die Zonen können auch durch Besprühen mit Vanillin-Schwefelsäure-Reagenz (66) oder Komarowsky-Reagenz (37) nach anschließendem Erhitzen bei 110°C als violette Zonen sichtbar gemacht werden. Es waren im DC des Handels-Quassins insgesamt 4 Substanzen nachzuweisen.

Bezogen auf die Ausgangssubstanz konnten durchschnittlich 75% Quassin und 20% Neoquassin isoliert werden.
Die Substanz, die wir als Quassinoid 3 bezeichneten, fiel in einer Konzentration von ca. 4 - 5% an. Sie war nicht mit dem von CASINOVI et al. (17) aus dem Gemisch isolierten Isoquassin oder 18-Hydroxyquassin identisch. In zwei von uns untersuchten Chargen des Handelsgemisches fanden wir ca. 2% 18-Hydroxyquassin im gleichen R_f-Bereich (0.40) wie Quassinoid 3. Das Quassinoid 3 war in diesen Mustern nicht aufzufinden.

Isoquassin, das durchschnittlich mit 0.05% im Handelsgemisch vertreten ist (R_f-Wert 0.88), schmeckt nicht bitter und wird deshalb an dieser Stelle nicht weiter besprochen.

Gleiche Mengenverhältnisse wurden auch nach säulenchromatographischer Auftrennung und nach der von TITTEL durchgeführten HPLC-Trennung erhalten.

Die Fraktion 2 (Neoquassin) erschien bei der photometrischen Detektion der HPLC-Trennung immer als Doppelpeak mit annähernd

gleichen Intensitäten. Auch bei der DC-Überprüfung wurde immer eine Doppelzone erhalten.

Durch mehrfaches Recycling gelang zwar eine Anreicherung einer der beiden Komponenten, doch bei anschließender Überprüfung der angereicherten Fraktion auf einer analytischen Säule bzw. mit Hilfe der DC hatte sich das ursprüngliche Verhältnis wieder eingestellt.

Da auch reinstes Neoquassin*) dieses Phänomen zeigt, liegt dieses vermutlich als Gemisch zweier isomerer Verbindungen vor, die sich nur geringfügig in ihrer Polarität unterscheiden.

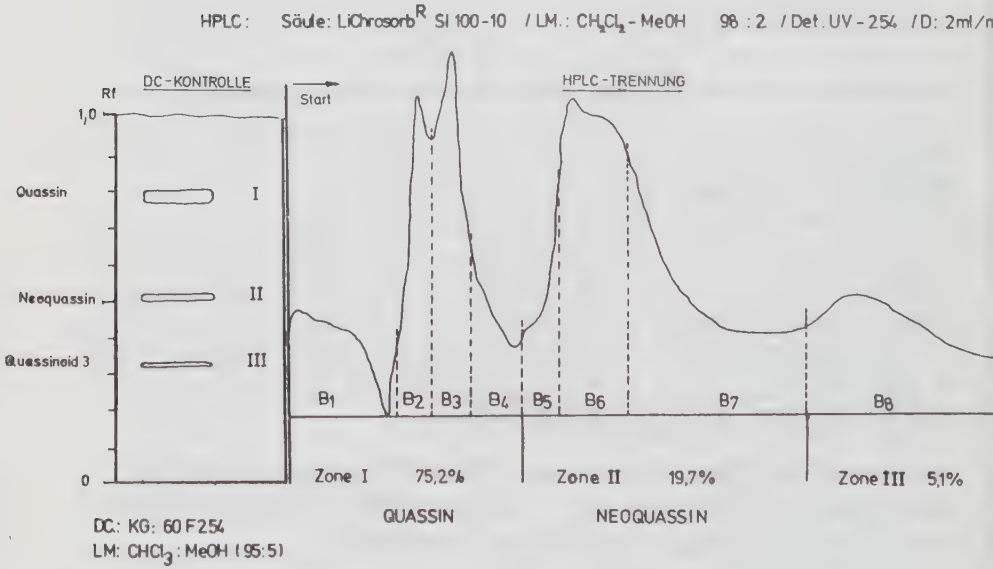


Abb. 22
DC- bzw. HPLC-Trennung des Quassin-Handelsgemisches

*) Wir danken Frau Professor Dr. J. Polonsky, Paris, für authentische Quassin- und Neoquassin-Testsubstanz.

Quassin läßt sich außerdem nach einer Vorschrift von VALENTA und Mitarb. (16) aus Neoquassin durch Oxidation mit Silberoxid darstellen. Da Quassin selbst bei dieser Reaktion nicht verändert wird, kann die Gewinnung direkt aus dem Handelsgemisch erfolgen:

Man löst das Gemisch in Äthanol-Wasser (4:3), gibt frisch gefälltes Silberoxid hinzu und erhitzt 15 Stdn. am Rückfluß. Nach dem Verdünnen der Reaktionslösung mit Wasser wird das Quassin mit Chloroform oder Dichlormethan ausgeschüttelt und aus Methanol-Wasser umkristallisiert.

6.4 Spektroskopie der Quassia-Bitterstoffe

Nachstehend sind in Tabellen die wichtigsten physikalischen und spektroskopischen Daten der isolierten Quassia-Bitterstoffe zusammengestellt. Sie stehen mit den Literaturangaben in Einklang und erleichtern die Identitätsprüfung, wenn keine Vergleichssubstanzen vorliegen.

1. Schmelzpunkte:

Quassin	222°C
Neoquassin	228°C
18-Hydroxyquassin	233°C
Quassinoid 3	197°C

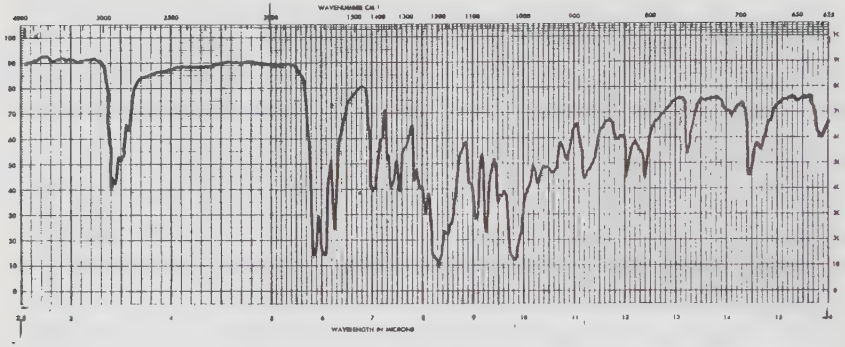
2. UV-Spektren (in EtOH):

	λ_{max}	ε
Quassin	255 nm	11650
Neoquassin	255 nm	12040
18-Hydroxyquassin	256 nm	12100
Quassinoid 3	257 nm	7650

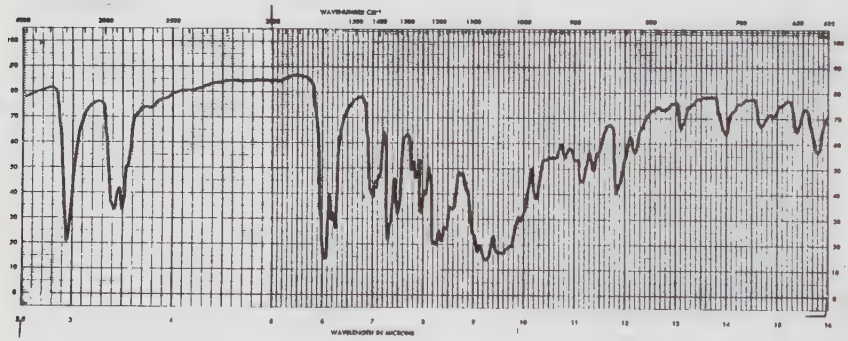
3. Optische Drehung:

	$[\alpha]_D^{20}$ (1%ige Lösungen in $CHCl_3$)
Quassin	+ 34.5°
Neoquassin	+ 41.0°
18-Hydroxyquassin	+ 24.0°
Quassinoid 3	+ 38.8°

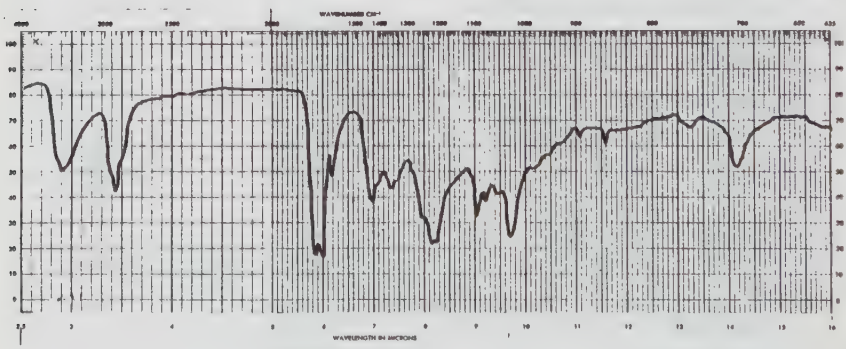
4. IR-Spektren der Bitterstoffe (Abb. 23)



Quassin



Neoquassin



18-Hydroxyquassin

Abb. 23

5. 60 MHz-H-NMR-Spektren:

Tabelle 5

NMR-Daten der Quassinoide

C-Atom:	C_2	C_3	C_4	C_7	C_8	C_9	C_{10}	C_{12}	C_{13}
Substituent:	OCH_3		CH_3		CH_3		CH_3	OCH_3	
Quassin	3.58	5.30;d	1.11;d	4.28;m	1.19	2.95	1.55	3.65	1.87 (CH_3)
Neo-quassin	3.62	5.35;d	1.11;d	3.95;m	1.20	3.15	1.54	3.55	1.85 (CH_3)
18-Hydroxy-quassin	3.60	5.32;d	1.13;d	4.38;m	1.20	3.02	1.56	3.67	4.42;s (CH_2-O-
Quassinoid 3	3.45	5.28;d	1.00;d	4.10;m	1.35	3.10	1.35	-	0.87;d (CH_3)

Die δ-Werte sind in ppm, bezogen auf TMS (int.) angegeben.

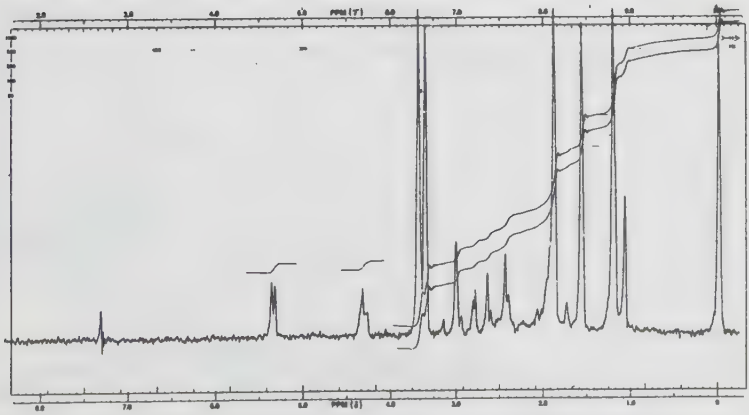
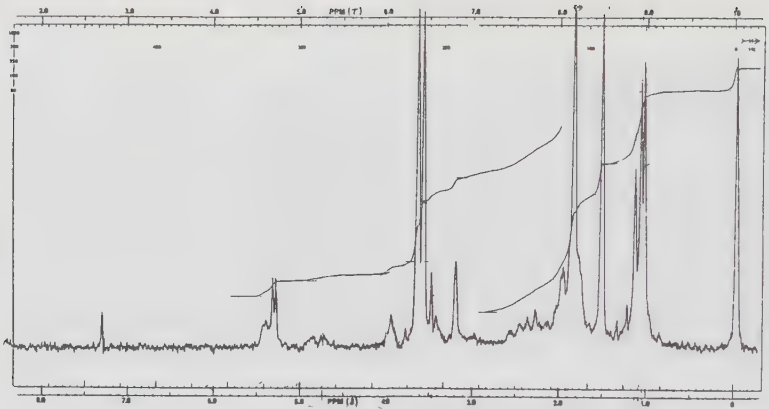


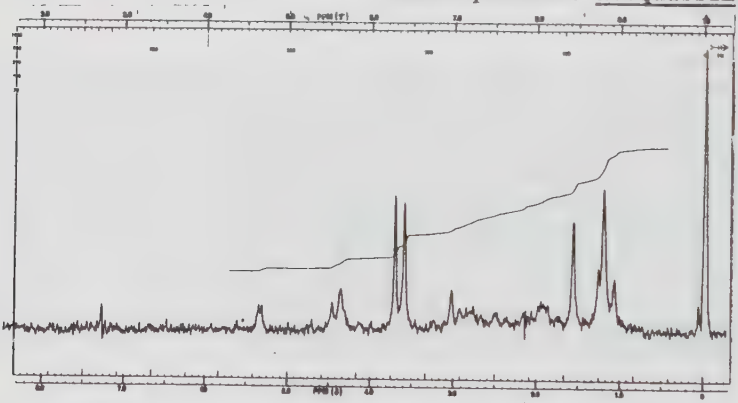
Abb. 24

60 MHz-H-NMR-Spektrum von Quassin ($CDCl_3$; TMS int.)

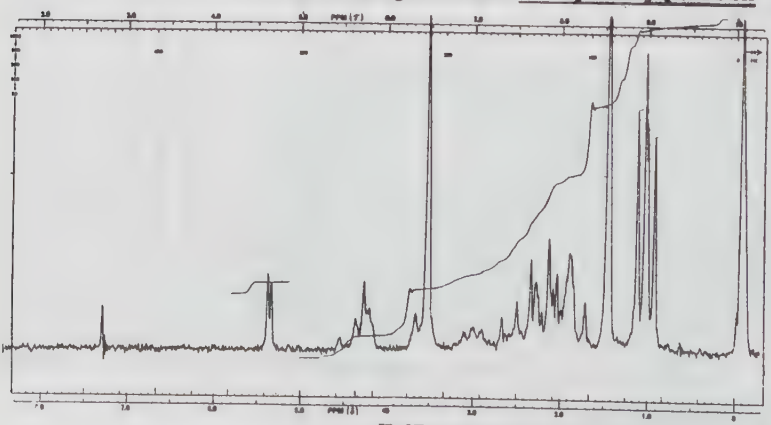
Fortsetzung Abb. 24



H-NMR-Spektrum: Neoquassin



H-NMR-Spektrum: 18-Hydroxyquassin



H-NMR-Spektrum: Quassinoid 3

Quassinoid 3

Ein bei einem HPLC-Trennungsgang aus Handelsquassin isoliertes Quassinoid (s.Kap. 6.3, S. 40) ist nach unserer Kenntnis bisher nicht beschrieben worden. Im NMR-Spektrum waren im Vergleich zu den bisher vorgestellten Quassinoiden folgende Unterschiede festzustellen:

Für die Methoxygruppe am C_{12} fehlt das typische Singulett bei δ = 3.60 ppm. Das für die Methylgruppe am C_{13} typische Singulett bei 1.85 ppm war verschwunden. Stattdessen fanden wir dieses Methylsignal bei 0.87 ppm zu einem Dublett aufgespalten (J = 6.5 Hz), so daß die Doppelbindung zwischen C_{12} und C_{13} in Quassinoid 3 hydriert sein mußte. Wie an der Integration des Multipletts bei 4.10 ppm zu erkennen ist, besitzt Quassinoid 3 in diesem Bereich ein zusätzliches Signal, das von der Lage her am besten einem Proton am C_{12} in Nachbarschaft zu einer Sauerstoff-Funktion zuzuordnen wäre.

Im Massenspektrum (M^+ = 376) fanden wir eine Abspaltung von 17 Masseneinheiten, die als sicherer Hinweis für eine Hydroxylgruppe gewertet werden kann.

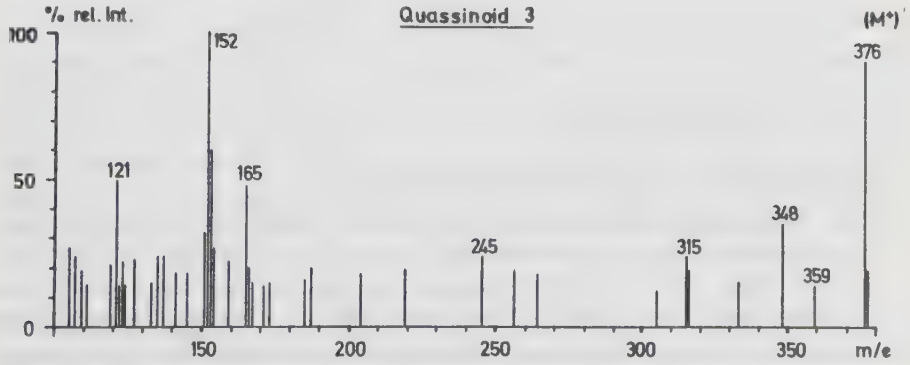


Abb. 25
Massenspektrum von Quassinoid 3

Wir nehmen daher an, daß es sich bei Quassinoid 3 um ein Dehydroquassin handelt, das am C_{12} entmethyliert ist (Abb. 26). Auch der im Vergleich zu Quassin stark verminderte ε-Wert von 7650 zeigt, daß in Quassinoid 3 nur einer der beiden α-, β-ungesättigte Ketogruppen vorhanden ist. Quassinoid 3 konnte von uns nur in einer Charge des Handelsquassins aufgefunden werden, so daß eine weitere Untersuchung wegen Substanzmangel nicht möglich war.

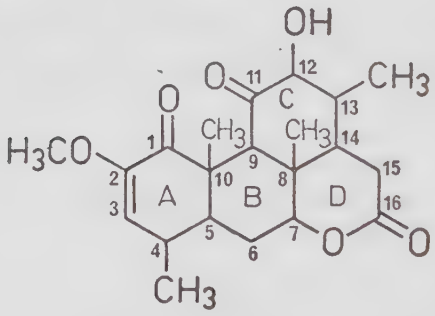


Abb. 26
Strukturvorschlag für Quassinoid 3

6.5 Sensorische Analyse

Bitterwerte der Quassia-Bitterstoffe

Da über die Bitterwerte der einzelnen Quassia-Bitterstoffreinsubstanzen keine Literaturangaben zu finden waren, wurde eine sensorische Bitterwertbestimmung an den Anfang der analytischen Untersuchungen gestellt. Zu prüfen war, ob die einzelnen Bitterstoffe für spätere Vergleiche mit anderen quantitativen Bestimmungsmethoden gemeinsam, oder, bei stark voneinander abweichenden Bitterwerten, getrennt bestimmt werden mußten.

In Tabelle 6 sind die von uns ermittelten Bitterwerte für die Reinsubstanzen und die authentischen Drogenmuster von Surinam- und Jamaika-Quassiaholz zusammengestellt. Die Durchführung der sensorischen Analyse und ihre statistische Auswertung sind im Experimentellen Teil (Kap. 11-3. S. 107) beschrieben.

Tabelle 6

Ermittelte Bitterwerte der Quassia-Bitterstoffe bzw. der Drogenmuster

Bitterstoff	Bitterwert
Quassin	17 000 000
Neoquassin	16 000 000
18-Hydroxyquassin	12 000 000
Quassinoid 3	8 000 000
Isoquassin	(nicht bitter)
Handelsquassin (Fa.Roth)	ca. 15 000 000
Jamaika-Quassia	45 000
Surinam-Quassia	55 000

Die Bitterstoffe Quassin und Neoquassin sind unter Berücksichtigung des "Vertrauensintervalls" sensorischer Bitterwertbestimmungen als in etwa gleichwertig anzusehen. KÄMPF ermittelte beispielsweise bei der sensorischen Enzianbitterstoffbestimmung mit 23 Testpersonen eine relative Standardabweichung von $\pm$ 24% (67), so daß der Unterschied in den Bitterwerten von nur ca. 6% bei Quassin und Neoquassin innerhalb der Fehlergrenze sensorischer Analysen liegt.

Ist 18-Hydroxyquassin in der Droge mit enthalten, so müßte die ermittelte Menge dieses Bitterstoffes zur Umrechnung auf den sensorisch ermittelten Gesamtbitterwert mit dem Faktor F = 0.75 multipliziert werden, da der Bitterwert von 18-Hydroxyquassin nur 12 000 000 beträgt. Das Quassinoid 3 liegt mit einem Bitterwert von 8 000 000 deutlich unter den Bitterwerten der anderen Quassi-

noide. Da es aber bisher in keinem der von uns untersuchten Drogenextrakte gefunden wurde, nehmen wir an, daß es sich bei dieser Verbindung möglicherweise um ein Artefakt handelt, das bei der Gewinnung von Handelsquassin entstand.

T a b e l l e 7

Vergleich mit anderen Bitterstoff-Reinsubstanzen

Bitterstoff	Droge	Bitterwert	Lit.
Amarogentin	Enzianwurzel	58 000 000	(68)
Absinthin	Wermutkraut	12 700 000	(69)
Limonin	Citrus-Arten	1 000 000	(70)
Naringin	Citrus-Arten	500 000	(71)
Chininhydrochlorid	Chinarinde	200 000	(72)

Ein Vergleich der ermittelten sensorischen Bitterwerte mit anderen pflanzlichen Bitterstoffen (s.Tab. 7) zeigt, daß Quassin und Neoquassin sehr hohe Bitterwerte besitzen, die nur von Amarogentin übertroffen werden. Die in älteren Literaturangaben zu findenden Bitterwerte für "Quassin" von 1 Million und darunter (73) bezogen sich mit Sicherheit nicht auf die Quassin-Reinsubstanz.

Auch ein Vergleich der Bitterwerte von authentischem Jamaika- und Surinam-Quassia-Holz mit heute offizinellen Bitterstoffdrogen zeigt, daß die Quassia-Droge einen etwa doppelt so starken bitteren Geschmack aufweist, wie die klassischen Bitterstoffdrogen Wermutkraut und Enzianwurzel (s.Tab. 8, S. 51).

T a b e l l e 8

Bitterwerte heute offizineller Bitterstoffdrogen

Bitterstoffdroge bzw.-Zubereitung	DAB 7/68 Bitterwert mindestens	DAB 7/DDR Bitterwert von ..... bis	Ph.Helv.VI Ph.Helv.-Einheiten pro g(mindestens)	ÖAB 9 Bitterwert mindestens	Ph.Eur.
Cortex Chinae	1.000	keine*)	keine	keine	keine
Cortex Condurango	-	-	150	keine	-
Folium Menyanthis	-	-	100	4.000	-
Herba Absinthii	15.000	10.000 bis 20.000	250	10.000	-
Herba Cardui benedicti	-	-	15	800	-
Herba Centaurii	2.000	-	100	2.000	-
Herba Marubii	-	-	-	3.000	-
Pericarpium Aurantii (Flavedo aurantii amari)	600	1.250 bis 2.500	15	600	-
Radix Gentianae	10.000	15.000 bis 30.000	200 (ad.us.vet.: 150)	10.000	keine

*) Die Angabe "keine" bedeutet, daß die Droge zwar offizinell ist, das betreffende Arzneibuch aber keine Angabe des Bitterwerts enthält.

6.6 Quantitative Extraktion der Bitterstoffe aus der Droge

Voraussetzung für die Gehaltsbestimmung ist die quantitative Extraktion aller bitter schmeckenden Bestandteile aus dem Drogenmaterial. In den Extraktionsvorschriften zur Bitterwertbestimmung der Arzneibücher wird das Drogenmaterial grundsätzlich mit Wasser extrahiert. Unterschiede bestehen in der Extraktionsdauer (30 Min., DAB 8/ÖAB 9; 60 Min. am Rückfluß,

DAB 7/DDR) und darin, daß die pulverisierte Droge in der Vorschrift des ÖAB 9 mit kaltem Wasser übergossen wird, in den anderen Pharmakopoeen mit siedendem Wasser. Bei der Überprüfung der verschiedenen Extraktionsverfahren ergaben sich bei der anschließenden sensorischen Grenzwertbestimmung Schwankungen im Bitterwert von über 30%, je nachdem wie extrahiert wurde. Im Drogenrückstand ließen sich bei sensorischer Überprüfung in allen Fällen noch Bitterstoffe nachweisen. Extrahierte man dagegen die Bitterstoffe mit organischen Lösungsmitteln wie z.B. Methanol, Äthanol oder Dichlormethan, so erhielt man Bitterwerte, die um ca. 20% höher lagen, als die nach den Arzneibuchmethoden ermittelten Grenzwerte (s.Tab. 9).

T a b e l l e 9

Sensorischer Bitterwert in Abhängigkeit vom Extraktionsverfahren

Drogeneinwaage (g)	Extraktionsmittel	Extraktionsverfahren	Rückstand	Bitterwert in Tausend
1.00	Wasser (1000 ml)	DAB 8	bitter	45 - 50
1.00	Wasser (1000 ml)	ÖAB 9	bitter	40 - 45
1.00	Wasser (1000 ml)	DAB 7/DDR	bitter	55 - 60
1.00	CH_2Cl_2 (3 x 150 ml)	3 x 3 Min. Omnimix	nicht bitter	60 - 65
1.00	Methanol (3 x 150 ml)	3 x 3 Min. Omnimix	nicht bitter	60 - 65
1.00	Äthanol 30% (1 x 150 ml)	1 x 5 Min. Omnimix	nicht bitter	60 - 65

Als das am besten geeignete Lösungsmittel zur quantitativen Extraktion erwies sich ein Gemisch von 70% Wasser und 30% Äthanol. Dabei genügt schon eine Extraktionszeit von 1 x 5 Min. am Omnimix (8000 U/Min.) zur quantitativen Extraktion der Bitterstoffe, während gleichzeitig der Großteil der liphophilen, harzartigen Verbindungen ungelöst zurückbleibt.

Sensorische Überprüfung des aufgetrennten Extraktes auf dem Dünnschichtchromatogramm

Um zu prüfen, ob mit den bekannten vier Verbindungen alle Bitterstoffe der Droge erfaßt wurden, haben wir die einzelnen Bereiche der Kieselgelplatte nach Chromatographie im System Chloroform-Methanol sensorisch auf An- bzw. Abwesenheit von bitter schmeckenden Verbindungen überprüft. Es wurden insgesamt nur drei bitter schmeckende Zonen gefunden, die mit Fluoreszenzlöschungen (im UV bei 254 nm) bei R_f 0.80, 0.55 und 0.40 übereinstimmten. Die unterste Zone bei R_f 0.40 zeigte im Vergleich zu den beiden anderen nur eine sehr schwache Bitterwirkung und Fluoreszenzminderung.

Die Zone bei R_f 0.80 entsprach Quassin, die bei R_f 0.55 dem Neoquassin. Die dritte, sehr viel schwächer bitter schmeckende Substanzzone bei R_f 0.40, die nicht in allen untersuchten Drogenmustern vorhanden war, erwies sich identisch mit 18-Hydroxyquassin und wurde von uns nur in einer Charge des Handelsquassins gefunden. Die sichere Identifizierung und Abgrenzung dieser Zone gegen Quassinoid 3, von dem 18-Hydroxyquassin chromatographisch nur schwer zu unterscheiden ist, gelang mit Hilfe der Massenspektroskopie, da sich die beiden Bitterstoffe in ihren Molekulargewichten unterscheiden (18-Hydroxyquassin: M^+ = 404; Quassinoid 3: M^+ = 376). Quassinoid 3 konnte in keinem der von uns untersuchten Drogenmuster nachgewiesen werden, so daß es sich möglicherweise um ein Artefakt oder um ein Quassinoid handelt, das aus einer anderen Simaroubaceen-Art stammt. Damit war gesichert, daß sich chemische oder andere quantitative Verfahren allein auf diese drei bzw. vier Verbindungen beschränken konnten.

6.7 Wahl einer geeigneten Bestimmungsmethode

Für eine quantitative Bestimmungsmethode bot sich die UV-Spektrophotometrie an, da alle in Frage kommenden Quassinoide ein UV-Maximum bei 255 bzw. 256 nm besitzen. Außerdem war vorteilhaft, daß Quassin, Neoquassin und 18-Hydroxyquassin auf Grund ihrer chromophoren Gruppen in ihren molaren Extinktions -

koeffizienten nur unwesentlich differierten. Quassin besitzt ein mol ϵ von 11650, Neoquassin von 12040 und 18-Hydroxyquassin von 12100. Die hohen ε-Werte bedeuten außerdem eine hohe Nachweisempfindlichkeit, die bei zu erwartenden Gehalten im Promillebereich (bezogen auf die Droge) erforderlich ist. Wir prüften zunächst, ob die Quassinoide bei der Bestimmung das Lambert-Beer'sche Gesetz im Bereich der in Frage kommenden Meßkonzentrationen erfüllen. Außerdem war festzustellen, ob die zu messenden Zonen nicht von Substanzen ganz oder teilweise überlagert werden, die ebenfalls im UV-Bereich von 255 nm absorbieren.

Aufstellung von Eichgeraden für Quassin, Neoquassin und 18-Hydroxyquassin

Eichgeraden ohne DC-Auftrennung

Entsprechend den Vorschriften des Ph.Eur.I und II (Kommentar S.68) verwendeten wir zur Aufstellung der Eichgeraden keine molaren Lösungen, sondern wir bestimmten die spezifische Extinktion ausgehend von einer 1%igen Lösung (1 g Substanz zu 100 ml gelöst).

Zur Messung der Eichgeraden wurden je 10.0 mg Testsubstanz in einem Meßkölbchen in 10 ml Methanol p.a. gelöst. Von den gleich konzentrierten Eichlösungen wurden Verdünnungsreihen hergestellt, die 20, 30, 50, 70, 90, 100 und 110 µl Substanz in 5.0 ml Methanol enthielten.

Je Konzentration und Testsubstanz wurden in zwei verschiedenen Ansätzen je 7 Paralellmessungen durchgeführt und der Mittelwert für die Eichgerade verwendet. Die Tabellen mit den Meßwerten und die Fehlerrechnungen sind im Kap.11.1,S.96, des Experimentellen Teils aufgeführt.

Als Ergebnis dieser Messungen konnte festgestellt werden, daß die Extinktionswerte und damit die Eichgeraden von Quassin und 18-Hydroxyquassin bei gleichen Konzentrationen praktisch identisch waren, während die Werte für Neoquassin durchschnittlich um ca. 2.5% über denen der beiden anderen Quassinoide lagen.

Die Eichgeraden (Abb. 27, S. 57) folgten streng dem Lambert-Beer'schen Gesetz.

Als spezielle Extinktionskoeffizienten wurden folgende Werte ermittelt:

Quassin	$E^{1\%}_{1\ cm}$:	300.5
Neoquassin	$E^{1\%}_{1\ cm}$:	308.2
18-Hydroxyquassin	$E^{1\%}_{1\ cm}$:	299.5

Da die speziellen Extinktionskoeffizienten der gemessenen Quassinoide im Höchstfall nur um ca. 2.5% differieren, was bei der größten gemessenen Konzentration von 110 µg/5 ml eine Abweichung von 3 µg bedeutet, besteht die Möglichkeit, Quassin als Standardsubstanz für alle drei Quassinoide zu verwenden, d.h. die Werte auf Quassin zu beziehen. Da auch die sensorisch ermittelten Bitterwerte von Quassin und Neoquassin untereinander nur um ca. 6% differieren, kann man unter Berücksichtigung der Genauigkeit sensorischer Bestimmungsmethoden (siehe hierzu Kap. 6.5, S. 49) davon ausgehen, daß Quassin und Neoquassin auch im Hinblick auf die sensorische Wertbestimmung als gleichwertig anzusehen sind.

18-Hydroxyquassin dagegen kann vom sensorischen Bitterwert her nicht als gleichwertige Substanz angesehen werden und muß, falls erforderlich, getrennt bestimmt werden.

Eichgeraden nach DC-Auftrennung

Da einer quantitativen Bitterstoffbestimmung eine chromatographische Auftrennung vorausgehen mußte, war zu klären, ob die direkte Extinktionsmessung im UV-Maximum auch nach Elution aus einer DC-Platte möglich ist. Eine wichtige Voraussetzung für reproduzierbare Analysenwerte ist daher eine optimale Elution der Substanz aus dem Kieselgel. In einer Versuchsreihe mit verschiedenen Lösungsmitteln und Extraktionszeiten, in der jeweils 50 µg Quassin-

bzw. Neoquassin-Testlösung auf eine Kieselgelplatte aufgebracht und nach dem Trocknen sofort wieder eluiert wurden, brachte die Verwendung einer Chloroform-Methanol-Mischung (70:30) die besten Ergebnisse. Der Extinktionsverlust gegenüber der direkt gemessenen Vergleichssubstanz lag unter 1%. Extrahiert wurde 3 Min. am Whirlimix in Schliffzentrifugengläsern. Kürzere Extraktionszeiten führten zu Verlusten bis zu 15%. Nach dem Extrahieren muß mindestens 10 Min. bei 6000 Umdrehungen zentrifugiert werden, da die Messung durch feinste, visuell nicht mehr erkennbare Trübungen empfindlich gestört werden kann.

Für die Eichgeraden der einzelnen Quassinoide nach DC-Auftrennung wurden die Testsubstanzen in Mengen von 20, 30, 50, 70 und 100 µg auf die Platte aufgetragen und entwickelt.

Nach Markierung der Zonen im UV-Licht bei 254 nm wurden diese aus der Platte ausgekratzt, in der von uns beschriebenen Weise extrahiert und gegen einen gleichbehandelten Kieselgel-Leerwert gemessen. Die in je fünf Parallelversuchen ermittelten Werte und ihre statistische Auswertung sind in Kap. 11.1, S. 96, zusammengefaßt.

Ergebnis:

Auch nach DC-Auftrennung bestand bei den Testsubstanzen im Bereich von 20 µg bis 100 µg eine lineare Abhängigkeit zwischen Konzentration und Extinktion. Allerdings liegen die Extinktionswerte im Vergleich zu den direktgemessenen Testsubstanzen bis zu 5% niedriger, was vermutlich auf die irreversible Adsorption an Kieselgel am Start bzw. entlang der Laufstrecke zurückzuführen ist (Eichgeraden siehe Abb. 27, S. 57).

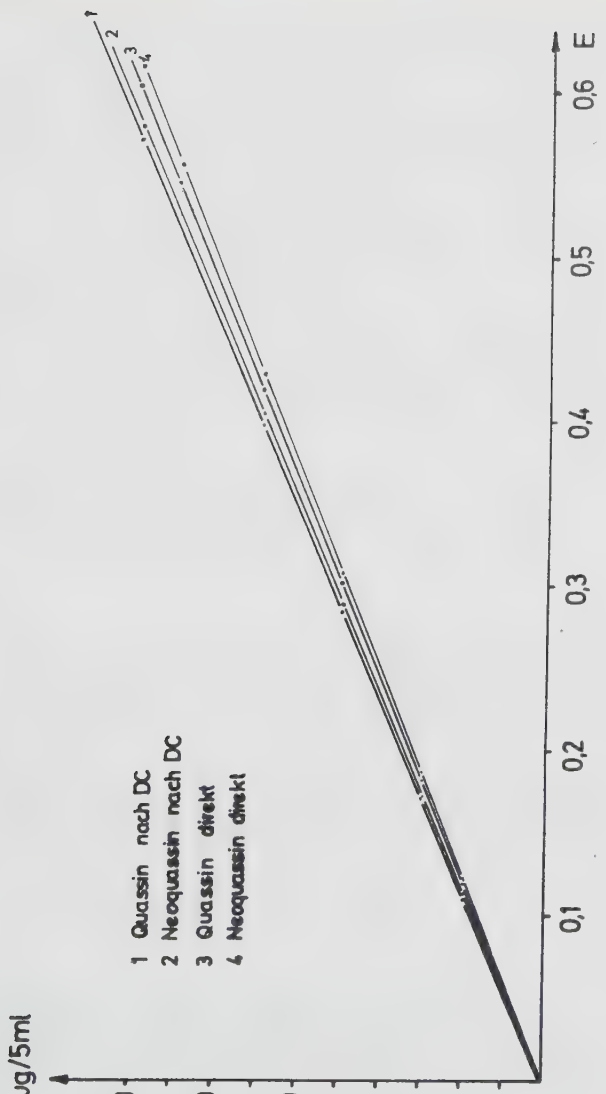


Abb. 27
Eichgeraden von Quassin und Neoquassin

6.8 Bestimmungen aus dem Pflanzenmaterial

Extraktion und Anreicherung der Quassia-Bitterstoffe

2.0 g feingepulvertes, getrocknetes Drogenmaterial wird mit 150 ml einer Äthanol-Wasser-(30:70)-Mischung am Omnimix extrahiert und die Lösung filtriert. Den im Filter befindlichen Drogenrückstand spült man mit 50 ml des Extraktionsmittels nach und überprüft sensorisch die Vollständigkeit der Extraktion. Sollte der Rückstand noch einen bitteren Geschmack haben, muß die Extraktion wiederholt werden. Die vereinigten Filtrate werden anschließend am Rotationsverdampfer auf 50 ml eingeengt und die Bitterstoffe mit 5 x 50 ml Toluol ausgeschüttelt.

Der Toluolanteil wird am Rotationsverdampfer eingeengt, filtriert und in einem 5 ml Meßkölbchen mit Toluol zur Marke aufgefüllt. Als Standard wird eine 0.2%ige methanolische Quassin-Lösung verwendet.

DC-Auftrennung und Photometrie

Die Dünnschichtchromatographie wird auf Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten durchgeführt. Mit einer Blutzuckerpipette oder einem geeigneten Auftragegerät werden 100 µl des Drogenextraktes bzw. 50 µl Standardlösung strichförmig aufgetragen. Die Auftragsmenge des Drogenextraktes sollte so gewählt werden, daß die Extinktionswerte für die Einzelbitterstoffe zwischen 0.1 und 0.7 liegen, da für Werte außerhalb dieses Intervalls das Lambert-Beer'sche Gesetz nicht mehr voll erfüllt wird.

Von jedem Extrakt werden mindestens 4 Parallelbestimmungen durchgeführt. Bezugssubstanz ist der Quassin-Standard, der pro Platte dreimal in gleicher Konzentration aufgetragen wird. Die Zuordnung von Neoquassin bzw. 18-Hydroxyquassin kann mit Hilfe der entsprechenden isolierten Testsubstanzen oder mit dem im Handel erhältlichen Quassin-Gemisch erfolgen. Die Substanzzonen werden unter dem UV-Licht markiert, mit einer

Rasierklinge vorsichtig abgeschabt, in Zentrifugengläser mit Schliffstopfen überführt und mit 5.0 ml einer Chloroform-Methanol-(70:30)-Mischung 3 Min. am Whirlimix extrahiert. Als Blindwert wird eine entsprechende substanzfreie Zone extrahiert. Zum Abtrennen des Kieselgels werden die Lösungen 10 Min. bei 6000 Umdrehungen zentrifugiert.

Die klare Lösung wird im Spektralphotometer bei 255 nm gegen den gleichbehandelten Blindwert gemessen.

Die Berechnung des Gehalts erfolgt nach der Gleichung:

$$\frac{\text{Gesamtbitterstoffgehalt der getr.Droge in \%}}{\text{(bezogen auf Quassin)}} = \frac{a \cdot (E_{Qu}+E_N) \cdot 0.0125}{E_{ST}}$$

a = Einwaage Quassin-Standard in mg
E_{Qu} = Extinktion Quassin
E_N = Extinktion Neoquassin

Sonderfall:

Ist 18-Hydroxyquassin anwesend, erfolgt die Berechnung des Gesamtbitterstoffgehalts bezogen auf Quassin nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gesamtbitterstoffgehalt d.getr.Droge in \%}}{\text{(bezogen auf Quassin)}} = \frac{a \cdot (E_{Qu}+E_N+E_H) \cdot 0.0125}{E_{ST}}$$

E_H = Extinktion 18-Hydroxyquassin x 0.75

Beleganalysen zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit

Zusatz von Bitterstoff-Reinsubstanz zur Droge

Durch Zusatz von Reinsubstanz zum Drogenmaterial wurde die in den vorausgegangenen Kapiteln beschriebene Bestimmungsmethode auf Genauigkeit und Reproduzierbarkeit überprüft.

Von einem Testgemisch, das 10.0 mg Quassin und 10.0 mg Neoquassin in 10.0 ml Äthanol p.a. enthielt, wurde zunächst ohne

DC-Auftrennung eine Eichgerade aufgestellt. Die ermittelten Extinktionswerte wichen dabei im Höchstfall um 1.5% von den theoretisch vorausberechneten Daten ab. Aus 2.0 g Handelsdroge bestimmten wir den Bitterstoffgehalt. Gleichzeitig wurde noch ein Parallelansatz analysiert, dem zusätzlich 1.5 ml des Bitterstoff-Testgemisches entsprechend 1.5 mg Quassin und 1.5 mg Neoquassin zugesetzt waren.

T a b e l l e 10

Wiederfindungsversuch: Lignum Quassiae + Quassin/Neoquassin-Reinsubstanz

Extrakt Nr. 5	Extinktionswerte		Gesamtgehalt	Mittelwerte
	Quassin	Neoquassin	mg/g Droge	mg/g Droge
Droge	0.220	0.278	2.223	
	0.215	0.300	2.299	
	0.217	0.280	2.218	
	0.210	0.285	2.209	
	0.215	0.285	2.232	
				$\bar{m}_1$ 2.236
Droge	0.380	0.470	3.794	
+	0.388	0.472	3.839	
Testgemisch	0.382	0.463	3.772	
	0.379	0.475	3.812	
	0.380	0.460	3.750	
				$\bar{m}_2$ 3.793
	Gefundener Mehrgehalt ($m_2 - m_1$)		= 1.555 mg/g Droge	
	Zugesetzte Bitterstoffmenge		= 1.500 mg/g Droge	
	Wiederfindung		= 103.6%	

Wie aus der Tabelle hervorgeht, wurden die zugesetzten Mengen an Quassin und Neoquassin zu 100% wiedergefunden. Die Bitterstoffe werden somit bei den der Gehaltsbestimmung vorausgehenden Extraktions- und Elutionsverfahren quantitativ erfaßt. Weitere Beleg-

analysen, in denen Quassin/Neoquassin-Testgemisch dem fertigen Analysenextrakt vor der DC-Auftrennung zugesetzt wurde, bestätigen die in Tabelle 10 gegebenen Daten.

Mögliche Störungen durch Begleitstoffe der Quassinoide auf der Kieselgelplatte

Zur Überprüfung der Störanfälligkeit der Methode durch Substanzen, die auf dem Dünnschichtchromatogramm knapp oberhalb oder unterhalb der Bitterstoffzonen liegen und ebenfalls im UV-Bereich der Quassinoide absorbieren, wurden diese Zonen ebenfalls ausgekratzt und am UV-Maximum der Bitterstoffe gemessen.

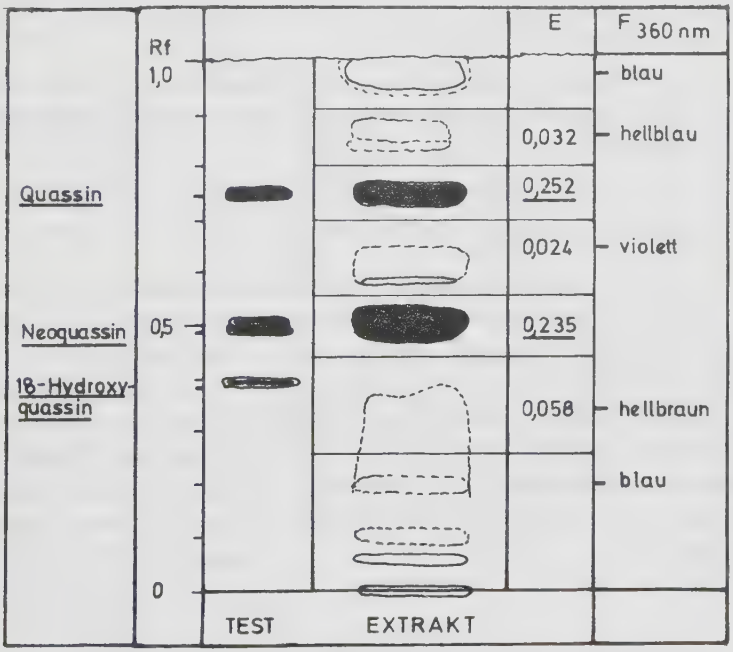


Abb. 28

UV-Absorption der benachbarten Zonen

Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254}
Laufmittel: Chloroform-Methanol (95:5)
Detektion: 1. UV 254: Fluoreszenzminderung
2. UV 360: Fluoreszenz

Wir fanden bei den an die Bitterstoffzonen angrenzenden Bereichen keine meßbaren Extinktionen, so daß bei guter DC-Auftrennung die gemessenen Extinktionen ausschließlich von den Bitterstoffen herrühren. Die vorliegenden Ergebnisse wurden im späteren Verlauf der Untersuchungen durch densitometrische Direktauswertung des Chromatogramms bestätigt (Grundlinientrennung).

Außerhalb der geprüften Kieselgelzonen befinden sich drei nicht bitterschmeckende Zonen, die im UV-Bereich bei 255 nm absorbieren:

- Für eine hellbraun-fluoreszierende Zone unterhalb von Neoquassin (R_f 0.35), fanden wir einen Extinktionswert von 25% bezogen auf Neoquassin.
- Eine violett-fluoreszierende Zone oberhalb von Neoquassin (R_f 0.60), ergab eine Extinktion von ca. 10% des Neoquassin-Wertes und
- eine hellblau-fluoreszierende Zone bei R_f 0.90 oberhalb von Quassin, lieferte bis zu 13% der Quassin-Extinktion.

Die quantitative Bestimmung kann daher nur durchgeführt werden, wenn die Bitterstoffzonen auf dem Chromatogramm von keiner dieser Zonen überlagert werden. Enthält die Droge zusätzlich 18-Hydroxyquassin, so besteht die Gefahr einer partiellen Überlagerung mit der hellbraun-fluoreszierenden Zone bei R_f 0.35. Eine exakte Trennung dieser beiden Zonen ist aufgrund der vorangegangenen Messungen unbedingt erforderlich und geschieht am besten durch mehrmaliges Entwickeln des Chromatogramms in dem gleichen Laufmittel.

6.9 Vergleich mit anderen Bestimmungsmethoden

Direkte photometrische Bestimmung nach Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)

Parallel zur DC-Gehaltsbestimmung wurde außerdem eine direkte photometrische Analyse nach HPLC-Auftrennung im System Dichlormethan-Methanol (98:2) durchgeführt. Die Registrierung der Fraktionen und ihre Konzentrationsmessung erfolgte photometrisch bei 254 nm in einer Durchlaufküvette. Abb. 29, S. 64, zeigt das Trennergebnis: Quassin und Neoquassin sind gut abgetrennt. Neoquassin erscheint, wie bereits beschrieben, als Doppelpeak. Bezogen wurde der Gehalt auf Quassin- bze. Neoquassin-Testsubstanz als externen Standard.

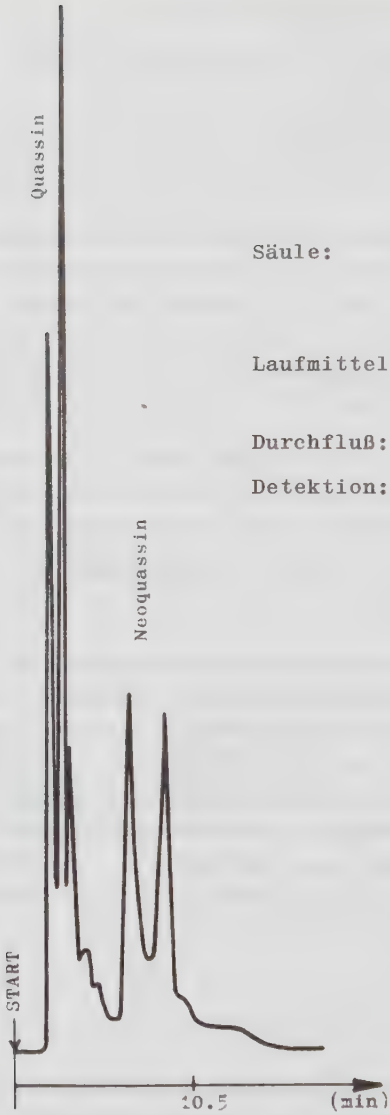
Die Auswertung erfolgte durch Integration der Peak-Höhen. Eine Gegenüberstellung der ermittelten prozentualen Bitterstoff-Gehalte nach der HPLC-Methode und nach DC-Auftrennung ist in der folgenden Tabelle zusammengefaßt.

Tabelle 11

Bitterstoffkonzentrationen in % (bezogen auf die Droge) nach DC und HPLC-Auftrennung

Bitterstoff	DC-Methode Ermittelter Gehalt in %	HPLC-Methode Ermittelter Gehalt in %	Abweichung in %
Quassin	0.059	0.057	3.4
Neoquassin	0.100	0.091	9
18-Hydroxyquassin	-	-	-
Gesamt-Bitterstoff-Gehalt	0.159	0.148	7

Während die Gehalte für Quassin gut übereinstimmen, machte die exakte Bestimmung des Neoquassin-Doppelpeaks mit der HPLC-Methode einige Schwierigkeiten. Die Auswertung aufgrund der Integration der Peak-Höhen erfordert eine Grundlinientrennung



Säule: Li-Chrosorb^{R} SI 100 (30 cm x 4 mm ID, Stahl)

Laufmittel: Dichlormethan-Methan (98:2)

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: UV 254 nm

Abb. 29
HPLC-Trennung des Rohextraktes aus Quassia-Holz (nach TITTEL)

mit möglichst steilem Anstiegswinkel der Peaks. Diese Bedingung wurde im Falle des Quassins voll erfüllt. Beim Neoquassin war ein signifikanter Unterschied im Kurvenverlauf zwischen Reinsubstanz und Extrakt zu beobachten. Im Extrakt ist die Desorption des Neoquassins von der stationären Phase im Vergleich zur Reinsubstanz verzögert, was zu breiteren und niedrigeren Peaks führt. Dieses Phänomen tritt auch bei Zusatz von Neoquassin-Reinsubstanz zum Extrakt auf. Das unterschiedliche Desorptionsverhalten führt dazu, daß gleiche Konzentrationen an Neoquassin nach Einspritzen der Standard-Lösung als steiler Doppelpeak, im Falle des Analysenextraktes als zwei deutlich getrennte, stark verbreiterte Peaks erscheinen, wodurch die Gehaltsbestimmung durch Integration der Peak-Höhen hier ungenau wird. Im Falle einer Auswertung der Peak-Flächen fanden wir für Neoquassin je nach Meßkonzentration bis zu 10% höhere Gehalte, die sich mit den Analysenwerten der DC-Methode korrelieren ließen. Die nach der DC- und HPLC-Methode ermittelten Bitterstoffgehalte eines Testextraktes sind in Tab. 11, S. 64, zusammengefaßt. Die prozentuale Abweichung des nach der DC-Methode ermittelten Gesamtbitterstoffgehalts betrug im Vergleich zur HPLC-Methode ca. 7%. Der Vorteil der HPLC-Gehaltsbestimmung liegt im geringen Zeitaufwand, da eine vollständige Analyse nur wenige Minuten dauert. Der Bezug der Extinktionskurven auf nur eine Standardsubstanz, wie im Falle der dünnschichtchromatographischen Gehaltsbestimmung führt hier nicht zu reproduzierbaren Werten. Als externer Standard müssen daher immer Quassin und Neoquassin mitverwendet werden. Bei den durch die HPLC-Methode untersuchten Drogenmustern war 18-Hydroxyquassin nicht nachzuweisen.

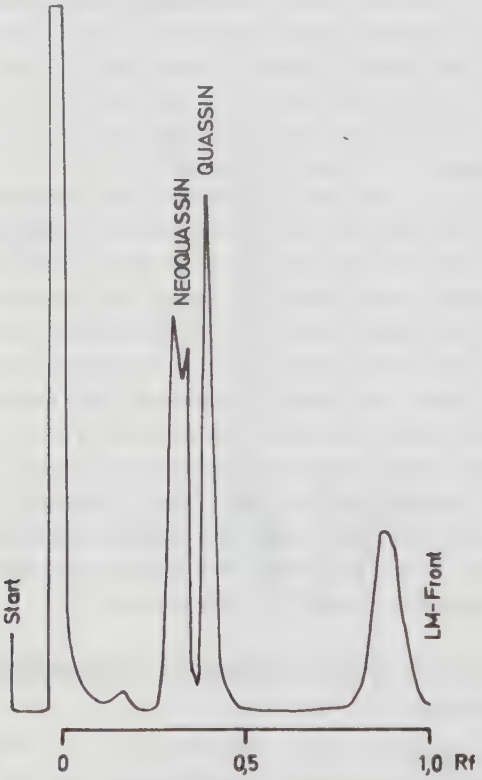
Densitometrische Direktauswertung nach zirkularchromatographischer Auftrennung mit dem HPDC-Scanner

Eine dritte Möglichkeit zur quantitativen Bestimmung der Bitterstoffe fanden wir in der densitometrischen Direktauswertung bei 254 nm nach zirkularchromatographischer Auftrennung des Drogenextraktes.

Die Zirkularchromatographie wurde auf 10 x 10 cm Kieselgelfertigplatten für die Nano-DC (Fa.Merck) im CAMAG U-KAMMER-System nach Kaiser (Fa.Camag, Schweiz) durchgeführt. Der Probenauftrag erfolgte

mit einem automatischen Dosiergerät (Nanomat; Fa. Camag).

Nach der zirkularen Entwicklung des Chromatogramms (Dauer 4 Min.) im Laufmittel Dichlormethan-Methanol (99:1) wurden die einzelnen Bitterstoff-Zonen densitometrisch mit dem HPDC-Scanner (Bedingungen siehe Experiment. Teil, S.104)direkt ausgewertet. Die Ermittlung des Gehalts an Quassin und Neoquassin erfolgte durch Integration der Peak-Flächen.



Auftragemenge:
1 µl (2.0 g Droge/5.0 ml)

Entwicklung: Zirkular
(U-Kammer nach Kaiser)
10 x 10 cm HPTLC-Platten
(Merck)

Laufmittel: Dichlormethan-
Methanol (99:1)

Laufzeit: 3 Min.

UV-Absorptionsmessung
(254 nm) (HPDC-Scanner)
Spalt: 2 x 0.3 mm
Auswertung: radial
Scan-Geschwindigkeit:
0.5 mm/sec

Abb. 30
Zirkularchromatographische Auftrennung des Extraktes

Nachdem die Linearität zwischen der Konzentration der Testsubstanzen und den Peak-Flächen durch Eichgeraden überprüft war (siehe Experimenteller Teil, Kap. 11.2, S. 106), wurde die Methode am Beispiel eines weiteren Drogenmusters mit der von uns ausgearbeiteten Analysenmethode verglichen.

T a b e l l e 12

Vergleich der ermittelten Bitterstoffkonzentrationen (Mittelwerte) in % bezogen auf die Drogeneinwaage

Bitterstoff	DC-Auftrennung, photometrisch ermittelter Gehalt nach dem Eluieren in %	Zirkularchromatographie, densitometrisch ermittelter Gehalt in %	Abweichung in %
Quassin	0.110	0.117	6
Neoquassin	0.144	0.147	2.5
18-Hydroxyquassin	-	-	-
Gesamt-Bitterstoff-Gehalt	0.254	0.264	3.9

Die Gegenüberstellung der prozentualen Bitterstoffgehalte in obiger Tabelle zeigt, daß beide Analysenverfahren relativ gut übereinstimmen. Auch hier ist es erforderlich, Quassin und Neoquassin als Standardsubstanzen einzusetzen, da die Auswertung des Doppelpeaks von Neoquassin Schwierigkeiten bereiten würde.

6.10 Umrechnung von Bitterstoffgehalt auf Bitterwert

Durch die Kenntnis der Einzelbitterwerte der Quassinoide sollte es möglich sein, die photometrisch ermittelten Bitterstoffgehalte in den Gesamt-Bitterwert der Droge bzw. des Handelsquassin-Gemisches umzurechnen und umgekehrt.

Die Berechnung wird am Beispiel des Handelsquassin-Gemisches erläutert:

Bei der quantitativen Bestimmung der Einzelbitterstoffe ermittelten wir folgende Gehalte (bezogen auf das Gesamtgemisch):

Quassin	64.34%	entsprechend	643.3 mg/g Ges.Gem.
Neoquassin	21.45%	entsprechend	214.5 mg/g Ges.Gem.
18-Hydroxyquassin	2.05%	entsprechend	20.5 mg/g Ges.Gem.

Der Bitterwert von Quassin und Neoquassin liegt im Mittel bei 17 000 000 (siehe Kap. 6.5, S. 49).

Bei einem Gehalt von 1 mg Bitterstoff/pro g Handelsquassin-Gemisch müßte rein rechnerisch der Bitterwert des Handelsquassins 17 000 betragen, da in diesem Falle ein Verdünnungsverhältnis von 1 : 1000 vorliegt.

Der theoretische Bitterwert des Handelsquassin-Gemisches berechnet sich daher nach der Formel I.

I. $BW\ (\text{Handelsquassin-Gemisch}) = a \cdot 17\,000$

wobei a Gesamtgehalt an Quassin und Neoquassin in mg/g Gemisch bedeutet. Enthält das Handelsquassin-Gemisch zusätzlich 18-Hydroxyquassin, das einen Bitterwert von 12 000 000 hat, dann ergibt sich rechnerisch der Bitterwert aus der Formel II.

II. $BW\ (\text{Handelsquassin-Gemisch}) = a \cdot 17\,000 + b \cdot 12\,000$

wobei a Gesamtgehalt an Quassin und Neoquassin in mg/g Gemisch und b Gehalt an 18-Hydroxyquassin in mg/g Gemisch bedeuten.

Für das untersuchte Handelsquassin-Gemisch errechneten wir einen Bitterwert von 14 822 600. Der sensorisch ermittelte Bitterwert betrug demgegenüber 15 000 000.

Damit korrelierte der photometrisch ermittelte Bitterstoffgehalt des Handelsquassin-Gemisches gut mit dem sensorisch ermittelten Bitterwert. Die Differenz betrug nur ca. 1.2%.

In Tabelle 13, S. 70, sind die sensorischen Bitterwerte verschiedener Drogenmuster den jeweils ermittelten Gesamtbitterstoffgehalten gegenübergestellt.

Die Bitterstoffgehalte der verschiedenen Drogenmuster lagen zwischen 1.4 und 3.0 mg/pro g Droge. Daraus ergaben sich rechnerisch Bitterwerte zwischen 23 800 und 51 000.

Die organoleptisch ermittelten Bitterwerte lagen demgegenüber bei 35 000 - 67 000, d.h. bis zu ca. 30% über den rechnerischen Werten.

Im Gegensatz zur guten Korrelierbarkeit von sensorisch ermitteltem Bitterwert und Bitterstoffgesamtgehalt im Falle des Handelsquassin-Gemisches war die Umrechnung bei Quassia-Drogenextrakten nicht ohne weiteres möglich.

Weshalb die sensorisch ermittelten Bitterwerte in den Quassiaextrakten in allen Fällen höher lagen als berechnet, könnte auf zusätzliche Substanzen im Quassia-Extrakt zurückzuführen sein, die den bitteren Geschmack verstärken, ohne selbst bitter zu schmecken. Umgekehrte Beispiele, die Reduzierung oder Aufhebung des bitteren Geschmackes durch andere Pflanzeninhaltsstoffe sind aus der Literatur bekannt. Eine andere mögliche Ursache könnte darin bestehen, daß ein höherer Bitterwert durch den auch in hoher Verdünnung auftretenden eigenartigen Nachgeschmack eines Quassia-Auszuges vorgetäuscht wird.

Tabelle 13

Vergleich der Bitterstoffgehalte und der organoleptisch bzw. rechnerisch ermittelten Bitterwerte von Quassia-Drogenmustern

Nr.	Droge Quassia:	% Gehalte				BW organolept. (in Tausend)	BW berechn. (in Tausend)	Unterschied (in %)
		Quassin	Neoquassin	18-Hydroxy-quassin	Ges.Bitterstoffe			
1	Surinam*)	0.180	0.061	-	0.241	50.2	40.9	19.4
2	Surinam*)	0.096	0.055	-	0.141	31.5	24.0	24.0
3	Jamaika*)	0.090	0.090	-	0.180	42.2	30.6	27.5
4	Handel**)	0.102	0.044	-	0.146	35.0	24.9	28.8
5	Handel**)	0.147	0.153	-	0.300	67.0	51.0	23.8
6	Handel**)	0.110	0.144	-	0.254	51.7	43.2	16.5
7	Handel**)	0.059	0.100	-	0.159	39.5	27.0	32.6
8	Handel**)	0.097	0.126	0.01	0.233	47.5	38.0	18.8

*) authentische Drogenmuster

*) Jamaika-Droge

6.11 Stabilität der Quassia-Bitterstoffe in der Droge und als Reinsubstanzen

A) Um die Haltbarkeit zu überprüfen, wurde ein Drogenmuster 2 Monate im Trockenschrank bei 40°C aufbewahrt. Bei der Lagerung ergab sich keine signifikante Gehaltsminderung (Gehalt vorher 0.22%, nachher 0.21%).

B) Im frisch bereiteten Pflanzenextrakt einer 10 Jahre gelagerten Droge konnte von uns weder Norquassin (R_f 0.75) noch Isoquassin (R_f 0.90) nachgewiesen werden, was auf eine hohe Stabilität der Bitterstoffe in der getrockneten Droge schließen läßt. In getrocknetem Zustand kann die Droge über einen längeren Zeitraum gelagert werden, ohne daß ein signifikanter Verlust im Bitterstoffgehalt eintritt.

Quassin löst sich im Alkalischen unter Öffnung des Laktonrings, wodurch der Bitterwert von 17 000 000 auf 1 000 000 absinkt. Durch Einleiten von CO_2-Gas in die schwach alkalische Lösung läßt es sich wieder vollständig zurückgewinnen (12). Neoquassin bleibt in alkalischer Lösung unlöslich. In äthanolischer Salzsäure entsteht bei Zimmertemperatur aus Quassin das nicht bitterschmeckende Isomere Isoquassin (14), während Neoquassin in der Kälte unverändert bleibt. Erhitzen in saurer Lösung führt bei beiden Bitterstoffen zu den entsprechenden Nor-Verbindungen, bei denen wir einen geringen sensorischen Bitterwert fanden. (17 000 000 → 10 000 000).

Z U S A M M E N F A S S U N G

Auf der Suche nach dem von WEGER postulierten cardiotonen Wirkprinzip von Lignum Quassiae erhielten wir im Verlauf eines chemischen Screenings Hinweise auf das Vorliegen von Alkaloiden in der Droge.

Die isolierten Alkaloidrohfraktionen zeigten im pharmakologischen Test am isolierten Papillarmuskel eine signifikante positiv inotrope Aktivität.

Aus den wirksamen Fraktionen wurden mit chromatographischen Methoden (HPLC-SC-präp.DC-Verfahren) vier Alkaloide isoliert, die in der Droge in einer durchschnittlichen Konzentration von 0.001% enthalten sind.

Die Strukturaufklärung der isolierten Verbindungen mit Hilfe spektroskopischer Methoden führte zu Alkaloiden der β-Carbolin- bzw. Harman-Reihe. Im einzelnen wurden Alkaloid I als N-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin, Alkaloid II als 5-Methoxy-canthin-6-on, Alkaloid III als Canthin-6-on und Alkaloid IV als 4-Methoxy-5-hydroxycanthin-6-on identifiziert.

Alkaloid I erwies sich als ein bisher noch nicht beschriebenes β-Carbolin-Alkaloid mit einer für Naturstoffe ungewöhnlichen N-Methoxy-Gruppe.
Die Alkaloide II - IV vom Typ des Canthins sind kürzlich aus verschiedenen Vertretern der Rutaceen- und Simaroubaceen-Familie isoliert worden. Bei einer fünften Verbindung handelte es sich um Scopoletin, das nur in Picrasma excelsa (Jamaika-Quassia) vorkommt und bisher in Simaroubaceen-Arten nicht beschrieben wurde.

Im Gegensatz zu anderen Harman-Alkaloiden, für die in neuesten Arbeiten eine positiv inotrope Aktivität am isolierten Papillarmuskel gefunden wurde, erwiesen sich die Alkaloide I - III als nicht aktiv, während Alkaloid IV sogar eine deutlich negative Aktivität zeigte.

Nach unseren Untersuchungen scheiden damit die isolierten Alkaloide als herzwirksames Prinzip für Lign.Quassiae aus. Möglicherweise enthält der wirksame Rohextrakt noch weitere, bisher nicht nachweisbare Verbindungen, oder das wirksame Prinzip ist thermo- und photoinstabil.

Der zweite Teil der Arbeit befaßte sich mit der Gehaltsbestimmung der Bitterstoffe. Es wurde ein verbessertes chromatographisches Verfahren zur Isolierung der Bitterstoffe aus der Droge und aus im Handel erhältlichem Quassingemisch ausgearbeitet. Als Trennmethoden bewährten sich neben der DC vor allem die Säulenchromatographie und die HPLC.

Aus dem Quassin-Handelsgemisch wurde ein bisher nicht bekanntes Quassinoid (Quassinoid 3) isoliert und aufgrund vergleichender spektroskopischer Untersuchungen mit bekannten Quassinoiden wurde die Struktur eines 12-O-Desmethyl-12,13-dehydroquassins vorgeschlagen.

Die für die Quassia-Bitterstoffe ermittelten sensorischen Bitterwerte lagen im Bereich von 17 000 000. Entgegen früherer Literaturangaben gehören Quassin und Neoquassin zu den am bittersten schmeckenden Naturstoffen.

Für die Bitterstoffe Quassin, Neoquassin und 18-Hydroxyquassin wurde eine direkte photometrische Gehaltsbestimmung nach DC-Auftrennung und Elution ausgearbeitet.

Ein zweites Analysenverfahren bediente sich der HPLC-Trennung und der direkten photometrischen Bestimmung in der Durchlaufküvette.

Als dritte Methode wurde ein Mikroanalysenverfahren der Quassiabitterstoffe entwickelt, bei dem 1-2 µl des Quassia-Extraktes zirkularchromatographisch aufgetrennt und densitometrisch bestimmt werden. Der Zeitaufwand der gesamten Analyse beträgt ca. 30 Min..

Die nach den verschiedenen Analysenverfahren ermittelten Bitterstoffgehalte zeigten gute Übereinstimmung.

Sensorisch ermittelter Bitterwert und photometrisch bestimmter Bitterstoffgehalt ließen sich im Falle des Quassin-Handelsgemisches gut korrelieren. Bei den untersuchten Drogenextrakten lagen dagegen die sensorischen Bitterwerte höher, als bei den aus der photometrischen Analyse berechneten Werten.

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

7.0 Herkunft der Drogen

Authentische Vergleichsmuster von Surinam-Quassia-Holz (Quassia amara) und Jamaika-Quassia-Holz (Picrasma excelsa) erhielten wir vom Botanischen Institut der Universität München.

Surinam-Quassia (= Quassia amara)
Größere Mengen an Surinam-Quassia wurden uns von der Universidad de Panama, Facultad de Ciencias Naturales y Farmacia zur Verfügung gestellt.

Jamaika-Quassia (= Picrasma excelsa)
Die von uns untersuchten Handelsdrogen stammten ausschließlich von Picrasma excelsa (= Jamaika-Quassia). Sie wurden in den Jahren 1975 - 1978 von den Firmen Celo (Minden), Carroux (Hamburg), Loibl (München) und verschiedenen Münchner Apotheken bezogen.

Die Isolierung der Alkaloide und Testung auf positiv inotrope Wirksamkeit erfolgte aus Picrasma excelsa-Droge, die im November 1976 von der Fa. Petereit (Hamburg) bezogen wurde.

8.0 Allgemeine Arbeitsmethoden

8.1 Dünnschichtchromatographie

1. Adsorbens: Kieselgel
   a) Präparative Trennverfahren:
      KG 60 F_{254} Fertigplatten, Schichtdicke 2 mm, 20 x 40 cm, Fa.Merck (Art.Nr. 5733)
      KG 60 F_{254} Fertigplatten, Schichtdicke 0.5 mm, 20 x 20 cm, Fa.Merck (Art.Nr. 5744)
   b) Analytik und Screening:
      KG 60 F_{254} Fertigplatten, Schichtdicke 0.25 mm, 20 x 20 cm, Fa.Merck (Art.Nr. 5715)

c) Zirkularchromatographische Auftrennung (U-Kammer System nach Kaiser) (74):
HPTLC-Fertigplatten, 10 x 10 cm, Fa.Merck (Art.Nr. 5628)

2. Laufmittelsysteme (Kieselgel-DC)
   a) Bitterstoffe: Chloroform-Methanol (95:5) und Chloroform-Methanol (99:1)
   b) Alkaloide: Äther p.a.
   c) Drogenscreening: Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13:10)
   d) Zucker: Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10)

3. Sprühreagentien
   Bitterstoffe:
   a) Vanillin-Schwefelsäure (nach MATTHEWS (66))
      Vanillin 0.5
      Schwefelsäure-Äthanol (40 + 10) 100.0
      Nachbehandlung: 5 Min. bei 110°C erhitzen

   Alkaloide:
   b) Dragendorff-Reagens (nach MUNIER und MACHEBOEUF (75))
      A: Bas.Wismutnitrat 0.85; Eisessig 10.0; Wasser 40.0
      B: Kaliumjodid 8.0; Wasser 20.0
      Vorratslösung: Gleiche Volumina A und B mischen.

      Sprühlösung: Vor Gebrauch werden 1 ml Vorratslösung mit 2 ml Eisessig und 10 ml Wasser gemischt.

      (Eine Empfindlichkeitssteigerung der Reaktion um das 50-fache gelingt durch Nachbesprühen mit 10%iger wässriger Natriumnitrit-Lösung)

      Zusätzliche Sprühreagentien des Drogenscreenings:
      Cumarine, Anthrachinone:
   c) Kaliumhydroxydlösung, 5% in Methanol (76)
      Fette, Sterine:
   d) Komarowsky-Reagens (37)
      A: Schwefelsäure 50%
      B: 4-Hydroxybenzaldehyd-Lösung, 2% in Methanol

      Sprühlösung: Kurz vor Gebrauch A und B im Verhältnis 1:10 mischen.
      Nachbehandlung: 5 Min. bei 105°C erwärmen.

Herzglykoside:

e) Kedde-Reagens (77)
A: Dinitrobenzoesäure, 3% in Äthanol
B: Natronlauge, 2-N

f) Antimon-III-chlorid-Lösung (78)
Gesättigte Lösung von Antimon-III-chlorid in Chloroform
Nachbehandlung: 5 Min. bei 100°C erhitzen.

Zucker:

g) Anilin-Phtalat (79)
Anilin 0.93; Phtalsäure 1.66; Butanol 100.0
Nachbehandlung: 10 Min. auf 105°C erwärmen.

4. Spezielle Alkaloidnachweisreagentien
Es wurden folgende spezielle Alkaloid-Nachweisreagentien verwendet:
Reagens nach WAGNER (80), VALSER (81), SONNENSCHEIN (80), SCHEIBLER (82) und MAYER (83).

8.2 Säulenchromatographie

1. Fertigsäulen Kieselgel 60, Größe B und C, Fa.Merck (Art.Nr. 10401 und 10402)
Treibgas: Stickstoff (2 atü)

2. Kieselgelsäulen (offen)
Kieselgel 60 (70 - 230 mesh) der Fa.Merck (Art.Nr. 7734) wurde mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlemmt.
Säulengrößen: 40 - 80 cm, Durchmesser: 2 - 6 cm.

3. Sephadexsäulen
Sephadex LH 20 der Fa.Pharmacia, Uppsala wurde nach 12stündigem Quellen in Äthanol in die Säule eingeschlemmt und über Nacht mit dem Elutionsmittel (ca. 10 - 15faches Säulenvolumen) gewaschen.
Säulengröße: 20 - 40 cm, Durchmesser: 1.5 - 2.5 cm.

4. Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)
a) Präparative Trennungen:
Pumpe: Waters M 6000 A

Einspritzsystem: Waters U 6 K
Säule(n): 1 oder 2 Prep Pak 500 Silica cartousche(n)
(Fa.Waters)
Eluens: Bitterstoffe: Dichlormethan-Methanol (98:2)
Alkaloide: Tetrachlorkohlenstoff-Diisopropyl-
äther (1:2)
Durchfluß: 100 ml/Min.
Detektion: Differential-Refraktometer und Photometer
(Altex 151)
Schreiber: Perkin Elmer 52
Papiervorschub: 5 mm/Min.
Einspritzmenge: 1 - 5 ml (= 1 g - 10 g vorgereinigter
Extrakt)

b) Quantitative Bestimmung der Bitterstoffe:
Säule: Li Chrosorb ^{R} Si 100 - 10 µm (ID 4 mm x 30 cm, Stahl)
Eluens: Dichlormethan-Methanol (98:2)
Durchfluß: 1 ml/Min.
Detektion: Photometer bei 254 nm (Altex 151)
Einspritzmenge: 5 - 20 µl (ca. 0.1% Lösung)

8.3 Auftragegeräte für die DC

Bandförmiges Auftragen:
Blutzuckerpipette (100 µl)
Cordis-Mikroapplikator 10 µl (für organische Lösungsmittel)
Desaga-Autoliner nach STAHL (präparative Trennungen)

Punktförmiges Auftragen (Analytik):
Nanomat (Nanodosiergerät der Fa.Camag)

8.4 Reinheit der Lösungsmittel

Für alle chromatographischen Trennungen (DC, SC, HPLC) wurden analysen-reine Lösungsmittel verwendet.

8.5 Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte
Die Substanzen wurden in der Trockenpistole über Phosphor-

pentoxid getrocknet. Die Schmelzpunkte bestimmten wir auf der Kofler-Heizbank der Fa.Reichert, Wien. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Optische Drehung
Die Messung erfolgte im lichtelektrischen Polarimeter der Fa.Zeiss (LEP A 2).

UV-Spektren
UV-Spektren wurden mit dem UV-Spektrometer DK-2 der Fa. Beckman aufgenommen.

UV-Absorptionsmessungen
UV-Absorptionsmessungen zur Bestimmung der Extinktion wurden mit einem Hitachi UV-vis Spectrometer -181-6 in 10 mm Küvetten durchgeführt.

IR-Spektren
Die KBr-Preßlinge der zu untersuchenden Substanzen wurden mit einem Beckman IR-8 Spectrophotometer gemessen.

^{13}C-NMR-Spektren
Die protonenbreitbandentkoppelten CMR-Spektren wurden an einem Varian XL 100 Kernresonanzspektrometer am Central Research Institute for Chemistry, Budapest, aufgenommen.

H-NMR-Spektren
Ein 270 MHz-Spektrum des Alkaloids I wurde am Institut für Organische Chemie der TU Berlin an einem Bruker HX-270 Kernresonanzspektrometer aufgenommen. Von der gleichen Substanz wurde auch ein 100 MHz-Spektrum auf einem Varian XL 100-Instrument aufgenommen.

Alle anderen H-NMR-Spektren wurden an unserem Institut mit Hilfe eines Varian A-60-A Kernresonanzspektrometers aufgezeichnet.

Massenspektren
Die Massenspektren wurden an unserem Institut mit dem Massenspektrometer MS 30 und am Institut für Organische Chemie der Universität München mit einem hochauflösenden Gerät MS 902, beide von der Fa.AEI, Manchester, aufgenommen.

8.6 Test auf positiv inotrope Aktivität

Zur Untersuchung wurden Papillarmuskeln aus den rechten Ventrikeln von unmittelbar zuvor getöteten Meerschweinchen verwendet. Die isolierten Papillarmuskeln wurden, wie in Abb. 31 zu sehen, zwischen Reizelektrode (3) und isometrischem Hebel (1) eingespannt und in einem auf 37°C temperierten Organbad (50 ml) von einem Gemisch aus 95% O_2 und 5% CO_2 durchströmt. Die gelösten Substanzen setzte man in möglichst kleinen aber sicher abzumessenden Volumina dem Organbad zu. Während der Messung mußte die Ausgangsspannung und die Reizfrequenz des Papillarmuskels konstant gehalten werden, da eine Veränderung dieser beiden Parameter auch eine Veränderung der Kontraktionskraft zur Folge gehabt hätte. Die Registrierung der isometrischen Spannungsentwicklung erfolgte elektrisch, wobei der unter Nr. 1 in Abb. 31 angegebene Hebel durch einen entsprechenden Umformer (Transducer-Röhrer RCA 5734) ausgetauscht war.

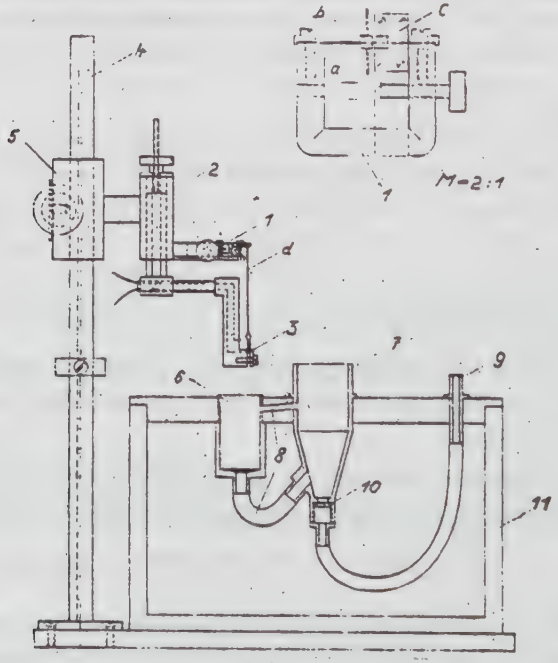


Abb. 31

Versuchsanordnung zur Messung der Kontraktionskraft isolierter Papillarmuskeln (nach REITER (36))

9.0 Spezielle Arbeitsmethoden

9.1 Dünnschichtchromatographisches Drogenscreening

1. Allgemeines Screening

Herstellung des Testextraktes:

10 g getrocknete, gepulverte Droge wurden mit 3 x 100 ml Methanol bzw. mit Diisopropyläther (zum Nachweis der Fette und Sterine) je 3 Min. extrahiert und das Extraktionsmittel im Vakuum auf 10 ml eingeengt.

DC:

Je 100 µl des Drogenextraktes wurden auf vier DC-Platten (KG 60 F_{254} Merck) aufgetragen und im Fließmittel Äthylacetat-Methanol-Wasser aufgetrennt.

Detektion:		
	Alkaloide:	Dragendorff-Reagenz
	Anthrachinone:	Kalilauge
	Herzglykoside:	Kedde-Reagenz bzw. Antimon-III-chlorid-Reagenz
	Flavone:	Naturstoffreagenz

Vergleichssubstanzen:

Für die Gruppenreaktionen wurden auf die einzelnen Platten folgende Vergleichssubstanzen aufgetragen:

Alkaloide: Atropin, Chinin, Coffein, Emetin

Anthrachinone: Aloin, Sennoside, Emodin

Herzglykoside: g-Strophanthin, k-Strophanthin, Digitoxin, Scillaren

Flavone: Rutin

2. Spezielles Screening

Zucker:

Hydrolyse:

1 ml des Testextraktes werden unter Zusatz von 3 ml 2-n Trifluoressigsäure 2 Stdn. bei ca. 90°C am Rückfluß gekocht. Anschließend wird die überschüssige Trifluoressigsäure am Rotationsverdampfer entfernt und die Zucker mit Wasser gegen Chloroform ausgeschüttelt.

DC:
20 µl der auf 1 ml eingeengten wässrigen Phase werden auf DC-Platten (KG 60 F_{254}) aufgetragen und im Fließmittel Chloroform-Methanol-Wasser (64:50:10) zusammen mit einem Zuckertestgemisch entwickelt.

Detektion: Anilin-Phtalat.

Sterine, Saponine, Fette:
DC:
50 µl des Diisopropylätherextraktes werden auf DC-Platten aufgetragen und im Laufmittel Chloroform-Methanol (95:5) bzw. Äther entwickelt.

Detektion: Komarowsky-Reagens

Vergleichssubstanzen:
Palmitinsäure, Stearinsäure, β-Sitosterin.
(Die Fettsäuren Palmitin-, Stearin-, Öl- und Linolensäure wurden außerdem noch gaschromatographisch nach Veresterung mit methanolischer Bortrifluoridlösung identifiziert).

Cumarine:
DC:
100 µl des methanol.Testextraktes werden auf DC-Platten (KG 60 F_{254}) in den Fließmitteln: Toluol-Äthylacetat (5:4); Toluol-Aceton (7:3); Chloroform-Methanol (95:5) mit folgenden Cumarin-Testsubstanzen chromatographiert.

Testsubstanzen:
Cumarin, Umbelliferon, Scopoletin, Imperatorin, Visnagin, Khellin

Detektion: UV 360 nm, methanolische Kalilauge

3. Spezielles Alkaloidscreening
(Labormethode nach BRÜNING (39))
Durchführung:
10 g Drogenpulver werden mit 75 ml 80%igem heißem Äthanol 5 Min. im Sorvallmixer extrahiert, filtriert und mit 25 ml heißem 80% Methanol nachgespült. Die vereinigten Äthanolextrakte werden im

Vakuum auf etwa 1 ml eingeengt, mit 1 ml 1%iger HCl versetzt und in einem kleinen Zentrifugenglas zentrifugiert.

Je 0.2 ml der HCl-sauren Lösung versetzt man auf einem Uhrglas (dunkle Unterlage) mit jeweils einem Tropfen der folgenden Alkaloidfällungsreagenzien:
Wagner's Reagens (80), Valser's Reagens (81), Sonnenschein's Reagens (82), Scheibler's Reagens (83) und Mayer's Reagens (84). Werden die Analysenlösungen mindestens so stark getrübt, wie eine parallel behandelte 0.01%ige Strychnin-Standardlösung, so gilt der Alkaloidnachweis als positiv.

Da dies bei unserem Extrakt der Fall war, wurde auf die anderen im Labortest vorgesehenen Verfahren verzichtet.

9.2 Isolierung der Alkaloide

1. Extraktion

1500 g fein gepulvertes Holz von Picrasma excelsa wurden - nach 12stündigem Vorquellen in 3 l Wasser - mit insgesamt 20 l Äthanol bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluß mazeriert. Nach Filtration wurde die im UV-Licht blau-fluoreszierende Lösung im Vakuum zur Trockne eingeengt und der Rückstand (45 g) in einer Methanol-Wasser (2:1)-Mischung (500 ml) unter Erwärmen gelöst. Der vom harzartigen Rückstand durch Zentrifugieren befreite Extrakt wurde anschliessend im Vakuum auf ca. 100 ml eingeengt und mit Dichlormethan solange ausgeschüttelt, bis der wässrige Anteil mit dem Valser-Test keine positive Alkaloidreaktion mehr zeigte. Die auf 4 - 5 ml eingeengte und filtrierte Dichlormethanlösung wurde zur HPLC-Trennung verwendet.

2. HPLC-Trennung (10.4 g Extrakt)

Geräte und Trennbedingungen:
(siehe Kap.8.2. Allgem.Arbeitsmethoden S. 77)
Verwendet wurden 2 hintereinandergeschaltete HPLC-Kartuschen und Tetrachlorkohlenstoff-Diisopropyläther (1:2) als Elutionsmittel.
Trennzeit: 90 Min.

Detektion: Photometer UV 280 nm, kombiniert mit Refraktometer.
Anzahl der Fraktionen: 22
Nachlauf: Nach Elutionsmitteländerung (neues EM: Dichlormethan-Methanol (98:2)) konnte noch eine Nachlauffraktion von 500 mg erhalten werden.

3. DC-Kontrolle der Fraktionen

Die Fraktionen wurden zur Trockne eingeengt und in 1 ml Dichlormethan-Methanol (92:8) aufgenommen.
Nach DC-Kontrolle (LM: 1) Äther, 2) Chloroform-Methanol (95:5)) wurden alle Fraktionen mit positiver Dragendorff-Reaktion noch mit Valsers-Reagens auf Alkaloide überprüft. Eine positive Alkaloidreaktion mit beiden Reagenzien bekamen wir nur mit den Fraktionen 7 - 10 und dem Nachlauf der HPLC-Trennung. Die Fraktionen 7 - 10 waren nach DC-Überprüfung identisch und wurden vereinigt.

4. Weitere Auftrennung

Fraktionen 7 - 10 (102 mg)

A) Präparative DC

Die weitere Reinigung der Hauptsubstanz der Fraktionen 7 - 10 (100 mg) gelang über präparative Kieselgelplatten (Schichtdicke 2 mm) in den Laufmitteln 1) Chloroform-Methanol (95:5) und 2) Äther.

R_f-Werte der türkis-fluoreszierenden Alkaloidzone:
LM 1) 0.85; LM 2) 0.90

Nach dieser Auftrennung lag das Alkaloid (I) chromatographisch rein vor. Im Verlauf der Strukturaufklärung zeigte sich, daß Alkaloid I noch mit Spuren eines Sterins verunreinigt war. Die Abtrennung des Sterins gelang folgendermaßen:

B) Säulenchromatographie (Sephadex LH 20)

Beschreibung der Säule: (siehe Kap. 8.2, S. 77)
Elutionsmittel: Äthanol p.a.
Detektion: UV 360 nm
Ca. 20 mg Rohalkaloid I wurden mit einer Pipette auf die Säule aufgetragen. Der Durchlauf des Elutionsmittels be-

trug 30 - 35 Tropfen/Min.
Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden Fraktionen à 5 ml aufgefangen. Fraktion 13 - 18: Alkaloid I, ca. 15 mg, M^+ = 224.

5. HPLC-Nachlauf

A) Säulenchromatographie

Die Auftrennung der HPLC-Nachlauffraktion (500 mg) gelang mit der in Kap. 8.2, S. 77, beschriebenen Kieselgelfertigsäule Größe C.

Die in 2 ml Chloroform-Methanol (95:5) gelöste Fraktion wurde mit einer Injektionsspritze langsam auf das Adsorbens appliziert und mit Hilfe von Stickstoff als Trägergas mit folgenden Elutionsmitteln chromatographiert:

1. 2000 ml Chloroform-Methanol (95:5)
2. 3000 ml Chloroform-Methanol (92:8)
3. 5000 ml Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:13:10)

Die Tropfgeschwindigkeit betrug 25 - 30 Tropfen pro Minute. Es wurden 20 Fraktionen à 500 ml gesammelt und dünnschichtchromatographisch (Laufmittel Chloroform-Methanol) überprüft. Dragendorff-positive Fraktionen wurden anschließend mit dem Valser-Reagens überprüft. In den dünnschichtchromatographisch einheitlichen Fraktionen 1 - 3 (45 mg) und 10 - 16 (130 mg) konnten Alkaloide nachgewiesen werden, während die Fraktionen 17 - 18 eine positive Dragendorff-Reaktion zeigte, aber einen negativen Valser-Test.

B) DC-Reinigung

Aus den Fraktionen 1 - 3 konnten mit Hilfe präparativer DC an Kieselgel in den Laufmitteln 1) Äther p.a. und 2) Chloroform-Methanol (95:5) zwei im UV-Licht leuchtend blau fluoreszierende, reine Alkaloidzonen abgetrennt und mit Aceton aus dem Kieselgel eluiert werden:

Alkaloid II, 5 mg, weiße Nadeln, aus Methanol-Wasser umkristallisiert, Smp.: 240°C

Alkaloid III, 20 mg, weiße Nadeln, aus Methanol-Wasser umkristallisiert, Smp.: 157°C

C) Reinigung durch Mikrosublimation

Aus den Fraktionen 10 - 16 (160 mg) erhielten wir durch Mikrosublimation bei 130°C im Vakuum ($4 \cdot 10^{-2}$ Torr) das Alkaloid IV kristallin.

Alkaloid IV, 30 mg feine gelbe Nadeln, Smp. 225°C.

6. Isolierung der Verbindung V

Die Fraktionen 16 - 18 (20 mg) zeigten bei der DC-Überprüfung im LM Chloroform-Methanol (95:5) einen leuchtend blau fluoreszierenden Hauptfleck, der über präparative DC (Adsorbens Kieselgel) im Laufmittel: Toluol-Äthylacetat (9:1) gereinigt wurde.
Weiße Nadeln, 8 mg, Kristallisiert aus Äthylacetat-Äther, Smp. 203°C.

9.3 Isolierung der Bitterstoffe aus Handels-Quassin

1. DC-Methode

Auftrennung:

100 - 150 mg im Handel erhältliches Quassin (Fa.Roth, Best. Nr. 2 - 7367) wurden in 1 ml Dichlormethan gelöst und mit Hilfe des Desaga-Autoliners strichförmig auf eine präparative Kieselgelfertigplatte 20 x 40 cm (Beschreibung: Kap. 8.1, S. 75) aufgetragen. Die Entwicklung erfolgt im Laufmittel Chloroform-Methanol (95:5) (ohne Kammersättigung).

Detektion:

Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels werden die Bitterstoffzonen (im UV-Licht bei 254 nm als Fluoreszenzminderungen zu erkennen) angezeichnet.

R_f-Bereiche:

Quassin	0.75 - 0.80
Neoquassin	0.55 - 0.60 (Doppelzone)
18-Hydroxyquassin (Quassinoid 3)	0.35 - 0.40

Extraktion und Kristallisation:

Die angezeichneten Zonen werden aus dem Kieselgel ausgekratzt und mit Chloroform eluiert (Glasfritte). Die Kri-

stallisation aller isolierter Quassinoide gelingt aus Methanol-Wasser.

Ausbeute: Quassin 70% der Ausgangssubstanz
Neoquassin 15% der Ausgangssubstanz

2. SC-Methode

Auftrennung:

500 mg Quassin (Fa.Roth) wurden in 1 - 2 ml Dichlormethan gelöst und mit einer Injektionsspritze langsam über den Lösungsmittelzulauf in eine Kieselgelfertigsäule 60 Größe C (siehe Kap. 8.2, S. 77) gespritzt. Der Druck des Trägergases (Stickstoff) wurde so reguliert, daß die Tropfgeschwindigkeit ca. 35 - 40 Tropfen/Min. betrug. Als Elutionsmittel wurde Chloroform-Methanol (98:2) verwendet. Fraktionen à 10 ml wurden mit einem Fraktionssammler aufgefangen. (Kühlraum + 2 bis + 4°C).

Detektion:

Die Detektion erfolgte photometrisch im UV-Bereich bei 280 nm mit Hilfe einer Durchlaufküvette.

Ausbeute:

Fraktion	Substanz	% der Ausgangsmenge
15 - 17	Isoquassin	0.2
18 - 23	Quassin	60
23 - 25	Quassin-Neoquassin	3
26 - 29	Neoquassin	16
30 - 32	Neoquassin-18-Hydroxyquassin	2
33 - 36	18-Hydroxyquassin	3
		84.2% (Gesamtausbeute)

Die Zuordnung der einzelnen Bitterstoffe kann, falls keine authentische Vergleichssubstanz verfügbar ist, über die R_f-Werte bei der DC-Trennung erfolgen (siehe Kap. 6.3, S. 42)

3. HPLC-Methode (nach TITTEL (65))

1000 mg Quassin-Gemisch (Roth), gelöst in 2 ml Dichlormethan, wurden direkt eingespritzt. Beschreibung des Geräts und der Trennbedingungen: (siehe Kap. 8.2, S. 78).

Aufgrund photometrischer Detektion in einer Durchlaufküvette(UV 280 nm)konnte das Gemisch in insgesamt 8 Fraktionen aufgetrennt werden.
Trenndauer: 38 Min.

Fraktion	Menge	% des Gemisches	Substanz
1 - 3	677 mg	75.2	Quassin
4 - 7	178 mg	19.7	Neoquassin
8	46 mg	5.1	Quassinoid 3

9.4 Quassin-Darstellung durch Oxidation von Neoquassin (nach VALENTA et al. (16))

500 mg Quassin-Gemisch (Fa.Roth) werden in 10 ml Äthanol gelöst und anschließend mit ca. 7 ml Wasser verdünnt. Nach Zusatz von frisch bereitetem Silberoxid (aus 2 g $AgNO_3$) wird das Reaktionsgemisch 15 Stdn. am Rückfluß gekocht, filtriert und mit ca. 20 ml Wasser verdünnt. Durch Ausschütteln dieser Lösung mit 5 x 20 ml Chloroform erhält man nach Filtration durch Aktivkohle 420 mg reinstes Quassin, das aus Äthanol-Wasser umkristallisiert wird. Smp.: 221°C.

9.5 Quassin-Neoquassin-Trennung durch Alkalibehandlung (nach LONDON et al. (12))

250 mg Quassin-Gemisch (Fa.Roth) werden in 2 ml Methanol gelöst. Nach Zugabe von 3 ml 10%iger wässriger Kalilauge läßt man die Reaktionslösung 24 Stdn. stehen, wobei kristallines Neoquassin ausfällt. (30 mg). Weiteres Neoquassin erhält man durch Ausschütteln der alkalischen Lösung mit Chloroform (15 mg).

Reinstes Quassin läßt sich aus der alkalisch-wässrigen Lösung durch vorsichtiges Ansäuern (Sättigen mit CO_2) zurückgewinnen.

Ausbeute bezogen auf das Ausgangsgemisch:

Quassin	65%
Neoquassin	15%

9.6 Isolierung der Bitterstoffe Quassin und Neoquassin aus der Droge

Das Methanol-Mazerat aus 500 g fein gepulverter Droge (10 l) wird am Rotationsverdampfer auf 100 ml eingeengt und durch Dekantieren bzw. Zentrifugieren vom Teer getrennt. Die beim anschließenden Verdünnen des Extraktes mit 150 ml Wasser entstehende voluminöse Fällung von gummiartiger Konsistenz wird ebenfalls abzentrifugiert. Nach dem Einengen der klaren, zitronengelben Lösung im Vakuum wird der Rückstand (ca. 8 - 10 g) in 50 ml Methanol aufgenommen und mit 50 ml 10%iger-wässriger Kaliumhydroxyd-Lösung versetzt. Rohes Neoquassin (500 mg) läßt sich mit Dichlormethan (5 x 50 ml) aus der alkalischen Methanol-Wasser-Schicht extrahieren und mit Hilfe der präparativen DC reinigen (Trennbedingungen: Siehe Kap. 8.1, S. 75 u. 76).

Nach schonendem Einengen des alkalischen Methanol-Wasser-Extraktes auf ca. 50 ml und anschließendem Sättigen der wässrig-alkalischen Lösung mit CO_2 fällt rohes Quassin bei pH 5.5 aus. Weiteres Roh-Quassin erhält man durch Ausschütteln der schwach sauren Lösung mit Dichlormethan. (Gesamtmenge an Roh-Quassin: 600 mg). Reinstes Quassin erhielten wir nach Reinigung des Roh-Quassins über präparative DC (Trennbedingungen siehe Kap. 8.1, S. 75).
Ausbeute: Die Gesamtausbeute an Quassin und Neoquassin liegt bei ca. 0.1 bis 0.2%, bezogen auf die Drogeneinwaage.

10.0 Meßdaten

10.1 Meßdaten der Quassia-Bitterstoffe

1. Quassin (Smp. = 222°C), weiße Kristalle,
$C_{22}H_{28}O_6$ (MG 388.466).
UV λ_{max}^{EtOH}: 255 nm (log ε = 4.06). $[\alpha]_D^{20}$ = +34.5°
(c = 1%, Chloroform). IR: KBr, cm^{-1}) 1745, 1695, 1680, 1640.

H-NMR: δ = 3.58 ppm (3 H, s; C_2-OCH_3), 5.30 ppm (1 H, d, J = 2.5 Hz; H_3), 1.11 ppm (3 H, s; C_4-CH_3), 4.28 ppm, (1 H, m; H_7), 1.19 ppm (3 H, s; C_8-CH_3), 2.95 ppm (1 H, s; H_9) 1.55 ppm (3 H, s; C_{10}-CH_3), 3.65 ppm (3 H, s; C_{12}-OCH_3), 1.87 ppm (3 H, s; C_{13}-CH_3). Lösungsmittel $CDCl_3$; Int.Stand. TMS; 60 MHz.

R_f-Wert: 0.78 (Fluoreszenzminderung im UV-254 nm) (DC: Kieselgel 60 F-254, LM: $CHCl_3$-MeOH 95:5)

2. Neoquassin (Smp. = 228°C), weiße Kristalle,

$C_{22}H_{30}O_6$ (MG 390.482).

UV: λ_{max}^{EtOH}: 255 nm (log ε = 4.08). $[\alpha]_D^{20}$ = +41° (c = 1% Chloroform). IR: (KBr, cm^{-1}) 3400, 1685, 1640.

H-NMR: δ = 3.62 ppm (3 H, s; C_2-OCH_3), 5.35 ppm (1 H, d, J = 6 Hz; C_4-CH_3), 395 ppm (1 H, m; H_7), 1.20 ppm (3 H, s; C_8-CH_3), 3.15 ppm (1 H, s; H_9), 1.54 ppm (3 H, s; C_{10}-CH_3), 3.55 ppm (3 H, s; C_{12}-OCH_3), 1.85 ppm (3 H, s; C_{13}-CH_3). Lösungsmittel $CDCl_3$; Int.Stand. TMS; 60 MHz.

R_f-Wert: 0.60 (Fluoreszenzminderung im UV-254 nm) (DC: Kieselgel 60 F-254, LM: $CHCl_3$-MeOH 95:5)

3. 18-Hydroxyquassin (Smp. = 233°C), weiße Kristalle

$C_{22}H_{28}O_7$ (MG 404.466).

UV: λ_{max}^{EtOH}: 256 nm (log ε = 4.86). $[\alpha]_D^{20}$ = +24° (c = 1%, Chloroform). IR: (KBr, cm^{-1}) 3450, 1725, 1680,1635.

H-NMR: δ = 3.60 ppm (3 H, s; C_2-OCH_3), 5.32 ppm (1 H, d, J = 2.5 Hz, H_3), 1.13 ppm, (3 H, d; J = 6 Hz; C_4-CH_3), 4.38 ppm (1 H, m; H_7), 1.20 ppm (3 H, s; C_{10}-CH_3), 3.67 ppm (3 H, s; C_{12}-OCH_3), 4.42 ppm (2 H, s; C_{13}-OCH_2). Lösungsmittel $CDCl_3$; Int.Stand. TMS; 60 MHz.

R_f-Wert: 0.40 (Fluoreszenzminderung im UV-254 nm) (DC: Kieselgel 60-F254, LM: $CHCl_3$-MeOH 95:5)

4. Quassinoid 3 (Smp. = 197°C), weiße Kristalle,

$C_{21}H_{28}O_6$ (MG 376.450).

UV: λ_{max}^{EtOH}: 257 nm (log ε = 3.88 MS: (ST 180°C, PT 150°C, 70 eV, R 1000/4 KV), (m/e,%) M^+ = 376 (90%)
(Werte unter 10% des Basepeaks sind nicht angegeben).
376 (90), 359 (13), 348 (35), 333 (12), 316 (19), 315 (24), 305 (12), 264 (18), 256 (197), 245 (24), 219 (19), 204 (18), 187 (24), 185 (20), 173 (15), 171 (14), 167 (15), 166 (20), 165 (48), 159 (19), 154 (23), 153 (60), 152 (100), 151 (32), 145 (18), 141 (18), 137 (20), 135 (20), 133 (15), 127 (23), 124 (14, 123 (21), 122 (14), 121 (50), 119 (21), 111 (14), 109 (19), 107 (24), 105 (27).

H-NMR: δ = 3.45 ppm (3 H, s; C_2-OCH_3), 5.28 ppm (1 H, d, J = 2.5 Hz; H_3), 1.00 ppm (3 H, d, J = 6 Hz; C_4-CH_3), 4.10 ppm (1 H, m; H_7), 1.35 ppm (3 H, s; C_8-CH_3), 3.10 ppm (1 H, m; H_9), 1.35 ppm (3 H, s; C_{10}-CH_3), 0.87 ppm (3 H, d, J = 6.5 H_2; C_{13}-CH_3).
Lösungsmittel $CDCl_3$; Int.Stand. TMS; 60 MHz.

R_f-Wert: 0.40 (Fluoreszenzminderung im UV-254 nm)
(DC: Kieselgel 60 F-254; LM: $CHCl_3$-MeOH 95:5)

10.2 Meßdaten der isolierten Alkaloide

Alkaloid I, N-Methoxy-1-vinyl-β-carbolin (Smp. = ca. 150°C)
gelbliche Subst.,
$C_{14}H_{12}N_2O$

UV: λ_{max}^{EtOH}: 223 nm (log ε = 4.23), 238 nm (4.23), 275 nm (4.07) 364 nm (3.81).

IR: (KBr) 1600 cm^{-1} (Aromat), 1550 cm^{-1} (N-OCH_3)

MS: (m/e, %): M^+ = 224 (28%) (Werte unter 10% des Base peaks sind nicht angegeben).
194 (14), 193 (100), 192 (14), 168 (19), 167 (11), 140 (14), 97 (11), 31 (63).

H-NMR: δ= 8.06 ppm (1 H, d, J = 8.0 Hz; H_5), 7.85 ppm (1 H, d, J = 8.0 Hz; H_6), 7.29 - 7.58 ppm (2 H, m; arom.Pr. H_7, H_8), 8.45 ppm (1 H, d, J = 5.1 Hz; H_3), 7.84 ppm (1 H, d, J = 5.1 Hz; (H_4); AMX-System (= Vinyl-Gruppe) δ_A= 7.71 ppm, δ_M= 6.60 ppm, δ_X= 5.64 ppm (J_{AM}= 17.0 Hz, J_{AX}= 10.6 Hz, J_{MX}= 2.1 Hz) Int.Stand. TMS, Lösungsmittel: $CDCl_3$; 270 MHz.

^{13}C-NMR: δ = 139 ppm, s, (C_1); 140.5 ppm, d, (C_3); 113.8 ppm, d, (C_4); 118 ppm, s, (C_{4a}); 127.6 ppm, s, (C_{4b}); 121.7 ppm, d, (C_5); 128.9 ppm, d (C_6); 121.1 ppm, d, (C_7); 109.5 ppm, d, (C_8); 138.8 ppm, s, (C_{8a}); 130.7 ppm, s, (C_{8b}); 131.7 ppm, d, 119.3 ppm, t, (Vinyl-Gruppe am C_1); 63.5 ppm, q, (-O CH_3). Lösungsmittel $CDCl_3$, Temperatur 56°C, Frequenz 25.2 MHz, Int.Stand. TMS.

Alkaloid II, 5-Methoxy-canthin-6-on, feine weiße Nadeln, 5 mg, Smp. = 240°C; Lit.: 242°C (50), $C_{15}H_{10}N_2O_2$. Ber.: C 71.22; N 11.30; H 3.83. Gef.: C 72.10; N 10.95; H 4.36.

UV λ_{max}^{EtOH}: 245 nm (log ε = 4.40), 293 (3.90), 337 (4.10), 353 (4.30), 370 (4.38).

IR: (KBr, cm^{-1}) 1670, 1630 (C=O, konj.), 1550 (Aromat).

MS: ST 170°, PT 120°, 70 eV R 1000/4 KV) (m/e, %) M^+ = 250 (100), 249 (43), 222 (11), 221 (43), 220 (15), 207 (16), 193 (10), 192 (20), 179 (13), 152 (11), 125 (13), 103 (17), 101 (15), 89 (12).

R_f-Wert: 0.85 (blaue Fluoresz. im UV-360 nm)
(DC: Kieselgel; LM: $CHCl_3$-MeOH 95:5)

Alkaloid III, Canthin-6-on, weiße Nadeln, 20 mg, Smp. = 157°C, Lit.: 156°C (51). $C_{14}H_8N_2O$. Ber.: C 75.67; N 12.66; H 3.48. Gef.: C 75.58, N 12.50; H 3.78.

UV λ_{max}^{EtOH}: 250 nm (log ε = 4.12), 259 (4.10), 267 (4.07), 300 (3.92), 347 (3.94), 362 (4.15) 381 (4.07).

IR: (KBr, cm^{-1}) 1670, 1630 (C=O, konj.), 1600 (Aromat).

MS: (ST 170°, PT 120°, 70 eV, R 1000/4 KV) (m/e, %) M^+ = 220 (100), 193 (10), 192 (58), 164 (10), 139 (10), 110 (10), 96 (10), 83 (10), 82 (12), 71 (10), 69 (15), 57 (15), 55 (13), 43 (15), 41 (10).

H-NMR: δ = 6.89 ppm (1 H, d, J = 10 Hz; H_4); 7.42 - 7.61 ppm (2 H, m, H_9; H_{10}); 7.82 ppm (1 H, d; J = 5.5 Hz, H_1); 7.92 ppm (1 H, d, J = 10 Hz; H_5); 7.97 ppm (1 H, q, J = 8 Hz; H_{11}); 8.54 ppm (1 H, q, J = 8 Hz; H_8); 8.73 ppm (1 H, d, J = 5.5 Hz; H_2).

R_f-Wert: 0.90 (dunkelblaue Fluoresz. im UV-360 nm) (DC: Kieselgel; LM: $CHCl_3$-MeOH 95:5)

Alkaloid IV, 4-Methoxy-5-hydroxy-canthin-6-on, feine gelbe Nadeln, 30 mg, Smp. = 225°C; Lit.: 225°C (54). $C_{15}H_{10}N_2O_3$. Ber.: C 67.66; N 10.52; H 3.78. Gef.: C 67.56; N 10.30; H 4.00.

UV $\overset{EtOH}{\lambda max}$: 241 nm (log ε = 4.50), 249 (4.61), 289 (4.00), 344 (4.00 357 (4.01) 375 (3.91)

IR: (KBr, cm^{-1}) 3320 (OH), 1710, 1620 (C=O, konj.), 1550 (Aromat)

MS: (ST 180°, PT 150°, 70 eV, R 1000/4 KV) (m/e, %) M^+ = 266 (100), 265 (54), 251 (13), 248 (22), 237 (27), 221 (10), 208 (11), 195 (11), 192 (36), 180 (18), 179 (10), 168 (10), 167 (10), 166 (15), 140 (29).

H-NMR: δ = 4.27 ppm (3 H, s; OCH_3); 7.37 - 8.50 ppm (4 H, m; $H_{7, 8, 9, 10}$); 8.02 ppm (1 H, d, J = 5.1 Hz; H_1); 8.74 ppm (1 H, d, J = 5.1 Hz; H_2). Lösungmittel DMSO-d_6, Int.Stand. TMS, 60 MHz.

Acetat: Das Acetat von IV wurde in der üblichen Weise präpariert. Rekristallisation aus Methanol-Wasser ergab Nadeln, Smp. = 191°C; Lit.: 192°C (54).

DC-Daten der isolierten Alkaloide:

Alkaloid Nr.	Bezeichnung	R_f-Werte LM: I	R_f-Werte LM: II	Fluoreszenzfarbe
I	N-Methoxy-1-vinyl-carbolin	0.85	0.90	türkis
II	5-Methoxy-canthin-6-on	0.10	0.85	dunkelblau
III	Canthin-6-on	0.31	0.85	hellblau
IV	4-Methoxy-5-hydroxy-canthin-6-on	0.20	0.68	hellbraun

Adsorbens: Kieselgelfertigplatten 60 F_{254} (Merck)
Laufmittel: I = Äther p.a.
II = Chloroform-Methanol (95:5)

10.3 Meßdaten von Verbindung V

Verbindung V, Scopoletin weiße Nadeln, 8 mg, Smp. = 203°C; Lit.: 204°C (55), $C_{10}H_8O_4$ (MG 192.042)

UV λ_{max}^{EtOH}: 230 nm, 255 nm, 300 nm, 348 nm, 390 nm

Infexion bei 260 nm.

DC: Adsorbens: Kieselgel 60 F_{254} Fertigplatten (Merck)

R_f-Wert	Laufmittel
0.35	Toluol-Äthylacetat (9:1)
0.65	Chloroform-Methanol (95:5)
0.54	Äther p.a.

Die Identität des isolierten Cumarins wurde aufgrund des unveränderten Mischschmelzpunktes mit Scopoletin-Vergleichssubstanz (Fa.C.Roth,Karlsruhe) sowie UV- und IR-Überlagerungsspektren bestätigt.

10.4 Einzelergebnisse der pharmakologischen Testung

(Beschreibung des Testmodells siehe Kap. 8.6, S. 80)
DC-Übersicht der getesteten Fraktionen und Reinsubstanzen siehe Kap. 5.0, S. 37).

Bezeichnung: Fraktion/Reinsubstanz/ Extrakt	Konzentration mg/50 ml Organbad	Wirksamkeit*)	Bemerkung
Quassin (Handelsgem.)	20	0	-
MeOH-Ges.Extrakt	50	++	=Jamaika-Quassia
H_2O-Anteil des Ges. Extraktes,gefriergetr.	20	0	-
F 140	11	+	
	bis 50	(+)	=Wiederholung n. 8 Wochen
F 147	15	++	-
	bis 8	0	=Wiederholung n. 8 Wochen
F 166	20	+++	-
	bis 32	+	=Wiederholung n. 8 Wochen
F 187	8	0	
DC 8	8	0	
DC 11	bis 4	- (!)	=deutlich negativ inotrop
DC 12	bis 6	- (!)	=deutlich negativ inotrop
DC 13/14	bis 6	- (!)	
Alkaloid I	bis 5	0	
	bis 10	0	=Wiederholung
Alkaloid b	bis 5	(+)	
Alkaloid III/II	bis 10	0	
Alkaloid IV	10	0	

*) Bewertungsskala: negativ inotrop -, unwirksam 0, gering positiv (+), deutlich positiv +, stark positiv ++, sehr stark positiv +++.

11.0 Quantitative Bestimmung der Quassia-Bitterstoffe

11.1 Aufstellung der Eichgeraden von Quassin, Neoquassin und 18-Hydroxyquassin

Direktmessungen

Die Eichgeraden (s.Abb. 27, S. 57) wurden mit den aus dem Handelsquassin isolierten getrockneten Reinsubstanzen aufgestellt.

Wir lösten jeweils 10.0 mg der einzelnen Bitterstoffe in 10.0 ml Methanol p.a. (Meßkölbchen, Temperatur 20°C ∓ 1). Von dieser Stammlösung stellten wir für jeden Meßpunkt sieben gleiche Verdünnungen her. Dabei wurden entsprechende Volumina der Stammlösung jeweils in ein 5 ml-Meßkölbchen gespült und zur Marke aufgefüllt.

Die Extinktionsmessung erfolgte in vorher gegeneinander abgeglichenen 1 cm Quarzküvetten bei 255 nm (Temperatur: 20°C ∓ 1) gegen Methanol als Leerwert.

Für die Eichgeraden wurden die Extinktionsmittelwerte der sieben bzw. fünf Parallelbestimmungen verwendet.

Die Fehlerrechnung bezieht sich auf den Quotient:

$$\frac{\text{Extinktionsmittelwert}}{\text{mg Substanz}} = \varepsilon'$$

Messungen nach DC-Auftrennung

Parallel zu den Direktmessungen wurden - ausgehend von den gleichen Stammlösungen - Eichgeraden der einzelnen Bitterstoffe nach DC-Auftrennung aufgestellt, um festzustellen, ob durch die Dünnschichtchromatographie ein Extinktionsverlust auftritt. Die Auswertung erfolgte analog der Direktmessung.

Die Einzelmeßdaten für die Eichgeraden (Abb. 27, S.) und ihre statistische Auswertung sind auf den folgenden Seiten zusammengefaßt.

Eichgerade von Quassin, direkt gemessen

1 µl= 1 µg	E							$\bar{x}$	ε'
20 µl	0.120	0.117	0.125	0.122	0.119	0.118	0.118	0.120	5.99
30 µl	0.185	0.186	0.178	0.180	0.180	0.179	0.182	0.181	6.04
50 µl	0.299	0.302	0.300	0.305	0.299	0.301	0.300	0.300	6.01
70 µl	0.418	0.421	0.425	0.417	0.420	0.421	0.420	0.420	6.00
90 µl	0.535	0.538	0.542	0.544	0.540	0.540	0.538	0.539	5.99
100 µl	0.595	0.605	0.605	0.599	0.599	0.600	0.602	0.600	6.00

$\emptyset$ = 6.005

Fehlerrechnung:

Mittelwert	$\bar{x}$	= 6.005
Standardabweichung	S	= 0.0187
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	= 0.0054
Variabilitätskoeffizient	V	= ±0.31%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	Sv	= ±0.54%

Eichgerade von Quassin, nach DC

1 µl= 1 µg	E					$\bar{x}$	ε'
20 µl	0.115	0.110	0.113	0.111	0.116	0.113	5.65
30 µl	0.167	0.174	0.171	0.168	0.175	0.171	5.70
50 µl	0.288	0.285	0.290	0.285	0.290	0.286	5.72
70 µl	0.396	0.396	0.400	0.410	0.397	0.400	5.71
100 µl	0.569	0.574	0.565	0.572	0.572	0.570	5.70

$\emptyset$ = 5.696

Fehlerrechnung:

Mittelwert	$\bar{x}$	= 5.696
Standardabweichung	S	= 0.0270
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	= 0.0078
Variabilitätskoeffizient	V	= ±0.47%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	Sv	= ±0.78%

Eichgerade von Neoquassin, direkt gemessen

1 µl= 1 µg	E							$\bar{x}$	ε'
20 µl	0.120	0.126	0.125	0.117	0.120	0.120	0.126	0.122	6.10
30 µl	0.180	0.189	0.179	0.188	0.184	0.185	0.184	0.184	6.14
50 µl	0.308	0.310	0.310	0.305	0.307	0.309	0.306	0.308	6.16
70 µl	0.425	0.430	0.429	0.428	0.431	0.423	0.434	0.430	6.14
90 µl	0.550	0.549	0.556	0.557	0.555	0.557	0.555	0.554	6.15
100 µl	0.615	0.610	0.612	0.617	0.618	0.616	0.612	0.614	6.14

$\emptyset$ = 6.138

Fehlerrechnung:

Mittelwert	$\bar{x}$	= 6.138
Standardabweichung	S	= 0.0204
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	= 0.0059
Variabilitätskoeffizient	V	= ±0.33%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	Sv	= ±0.59%

Eichgerade von Neoquassin, nach DC

1 µl= 1 µg	E					$\bar{x}$	ε'
20 µl	0.118	0.118	0.112	0.112	0.115	0.115	5.75
30 µl	0.180	0.178	0.169	0.175	0.171	0.174	5.80
50 µl	0.289	0.288	0.295	0.300	0.290	0.292	5.84
70 µl	0.410	0.408	0.403	0.405	0.405	0.406	5.80
100 µl	0.580	0.582	0.575	0.573	0.580	0.578	5.78

$\emptyset$ = 5.794

Fehlerrechnung:

Mittelwert	$\bar{x}$	= 5.794
Standardabweichung	S	= 0.0329
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	= 0.0104
Variabilitätskoeffizient	V	= ±0.57%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	Sv	= ±1.01%

Eichgerade von 18-Hydroxyquassin, direkt gemessen

1 µl= 1 µg	E							$\bar{x}$	ε'
30 µl	0.180	0.175	0.178	0.172	0.180	0.175	0.181	0.177	5.91
50 µl	0.305	0.301	0.295	0.293	0.300	0.299	0.303	0.299	5.99
70 µl	0.416	0.422	0.428	0.426	0.424	0.425	0.428	0.424	6.06
100 µl	0.594	0.605	0.600	0.602	0.604	0.595	0.599	0.600	6.00

$\varnothing$ = 5.99

Fehlerrechnung:

Mittelwert	$\bar{x}$	= 5.99
Standardabweichung	S	= 0.0616
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	= 0.0218
Variabilitätskoeffizient	V	= ±1.03%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	Sv	= ±2.21%

Eichgerade 18-Hydroxyquassin, nach DC

1 µl= 1 µg	E					$\bar{x}$	ε'
30 µl	0.180	0.170	0.172	0.170	0.168	0.172	5.73
50 µl	0.280	0.283	0.293	0.285	0.294	0.287	5.74
70 µl	0.405	0.408	0.412	0.412	0.408	0.409	5.84
100 µl	0.572	0.578	0.570	0.580	0.580	0.576	5.76

$\varnothing$ = 5.77

Fehlerrechnung:

Mittelwert	$\bar{x}$	= 5.77
Standardabweichung	S	= 0.0499
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	= 0.0176
Variabilitätskoeffizient	V	= ±0.865%
Schätzwert für den mittleren Fehler des Variabilitätskoeffizienten	Sv	= ±1.76%

11.2 Quantitative Bestimmung der Bitterstoffe im Drogenextrakt

A. DC-Methode

Analysenvorschrift:

Extraktion

2.0 g feingepulvertes, getrocknetes Drogenmaterial wurden mit 150 ml einer Äthanol-Wasser-(30:70)-Mischung 5 Min. am Omnimix extrahiert (8000 Umdr./Min.) und die Lösung filtriert. Den im Filter befindlichen Drogenrückstand spülte man mit 2 x 50 ml des Extraktionsmittels nach und überprüfte sensorisch die Vollständigkeit der Extraktion. (Sollte der Rückstand noch einen bitteren Geschmack gehabt haben, wurde die Extraktion wiederholt). Die vereinigten Filtrate engte man anschließend am Rotationsverdampfer auf ca. 50 ml ein.

Ausschüttelung der Bitterstoffe

Die Bitterstoffe wurden mit 5 x 50 ml Toluol aus dem wässrigen Analysenextrakt ausgeschüttelt.

Analysenlösung

Die vereinigten Toluol-Phasen wurden am Rotationsverdampfer auf ca. 3 - 4 ml eingeengt und in ein 5 ml Meßkölbchen filtriert. Den im Filter befindlichen Rückstand spülte man mit ca. 1.5 ml Toluol nach und füllte anschließend zur Marke auf.

Standardlösung

20 mg isoliertes, getrocknetes Quassin (Smp. 222°C), genau gewogen, wurden in einem 10 ml Meßkölbchen in Methanol p.a gelöst und zur Marke aufgefüllt.
(Diese Testlösung wurde auch als Standard für Neoquassin und 18-Hydroxyquassin verwendet).

Dünnschichtchromatographie

Adsorbens: Kieselgelfertigplatten 60 F_{254} , 0.25 mm, 20 x 20 cm (Fa.Merck)

Auftragemenge: Es wurden jeweils 100 µl Analysenlösung bzw 50 µl Standardlösung strichförmig mit einer Blutzuckerpipette (oder einem entsprechendem Auftragegerät) über

eine Strecke von 2.5 - 3 cm aufgetragen. Die Zuordnung von Neoquassin und 18-Hydroxyquassin konnte aufgrund der R_f-Werte oder mit Hilfe des Quassin-Gemisches (Fa.Roth) erfolgen.

Detektion: UV-254 nm, Fluoreszenzminderung.
Nach dem Abdunsten des Laufmittels wurden folgende Zonen unter dem UV-Licht (254 nm) markiert.

Quassin	R_f ca. 0.80
Neoquassin	R_f ca. 0.60 (Doppelzone)
(18-Hydroxyquassin	R_f ca. 0.40)

Bei Überlagerung der Bitterstoffzonen von einer der im Kap. 6.8, S. 61, beschriebenen fluoreszierenden Zonen wurde die Platte ein zweites Mal im gleichen Laufmittel entwickelt.

Bestimmung der Bitterstoffe
Die angezeichneten Bitterstoffzonen (s.Abb. 28, S. 61) wurden zusammen mit einer gleichgroßen substanzfreien Zone als Leerwert vorsichtig von der Platte abgeschabt und in ein 10 ml-Schliffzentrifugenglas gegeben. Die Extraktion der Bitterstoffe aus dem Kieselgel erfolgte nach Zusatz von 3 Glasperlen mit 5.0 ml ($V_o$llpipette) einer Chloroform-Methanol-(70:30)-Mischung am Whirlimix (3 Min.).
Zum Abtrennen des Kieselgels wurden die Lösungen anschließend 10 Min. bei 6000 Umdrehungen zentrifugiert.

Messung: Die überstehenden klaren Analysen- bzw. Standardlösungen wurden vorsichtig in Quarzküvetten pipettiert und in einem Spektralphotometer bei 255 nm gegen den gleichbehandelten Leerwert gemessen.

Berechnung des Gehalts:

$$\frac{\text{Gesamtbitterstoffgehalt d.getr.Droge in \%}}{\text{(bezogen auf Quassin)}} = \frac{a \cdot (E_{Qu}+E_N) \cdot 0.0125}{E\ ST}$$

a = Einwaage Quassin-Standard in mg
E_{Qu} = Extinktion Quassin
E_N = Extinktion Neoquassin

Sonderfall:

War 18-Hydroxyquassin anwesend, erfolgte die Berechnung des Gesamtbitterstoffgehalts bezogen auf Quassin nach folgender Formel:

$$\frac{\text{Gesamtbitterstoffgehalt d.getr.Droge in \%}}{\text{(bezogen auf Quassin)}} = \frac{a \cdot (E_{Qu}+E_N+E_H) \cdot 0.012}{E_{ST}}$$

E_H = Extinktion 18-Hydroxyquassin · 0.75

Da der Gesamtbitterstoffgehalt auf Quassin bezogen wurde, mußte der Unterschied im Bitterwert zwischen Quassin und 18-Hydroxyquassin mit dem Faktor 0.75 ausgeglichen werden.

B. HPLC-Methode (Gehaltsbestimmung)

Analysenextrakt: Wie bei der DC-Methode (s.S. 100) bereitet.

Standard:
Standardlösungen wurden für Quassin und Neoquassin hergestellt, wobei jeweils 10.0 mg der getrockneten Bitterstoffreinsubstanz genau gewogen in 10.0 ml Methanol p.a. gelöst wurden.

Gerätebeschreibung und Meßbedingungen:
Wie im Kap. 8.2, S. 77, beschrieben.

Linearität der Eichgeraden:
Zunächst wurde mit Einspritzmengen zwischen 5.5 und 15.3 µl Linearität der Eichgeraden des Quassin bzw. Neoquassin Standard überprüft (Einzeldaten und Statistik siehe TITTEL (65)).

Der Variabilitätskoeffizient lag bei ±3%. Anschließend wurden dreimal hintereinander je 5, 7.5, 10 und 15 µl des Analysenextraktes eingespritzt und die Peak-Höhe von Quassin und Neoquassin mit Hilfe eines angeschlossenen Rechners in Integratoreinheiten bestimmt. Die Mittelwerte für die Integratorauswertung berechneten wir aus den Quotienten

$$X = \frac{\text{Integratoreinheiten (JE)}}{\text{Eingespritzte Analysenmenge (µl)}}$$

die für alle Quassin- bzw. Neoquassin-Einzelpeaks gebildet wurden. Der Variabilitätskoeffizient lag bei ∓4%. Die Zunahme der für die Quassin- und Neoquassinpeaks ermittelten Integratoreinheiten verlief linear zur Einspritzmenge des Analysenextraktes.

Durchführung der Analyse:

Einspritzmenge: 10 µl (Standardlösungen und Analysenextrakt, je fünf Parallelversuche)

Berechnung des Gehalts:

1) % Quassin in der Droge = $\frac{a \cdot IE_{AQu}}{IE_{SQu}}$

a = Einwaage der Quassin-Standardsubstanz in mg

IE_{AQu} = Integratoreinheiten Quassin (Analyse)

IE_{SQu} = Integratoreinheiten Quassin (Standard)

2) % Neoquassin in der Droge = $\frac{a \cdot IE_{AN}}{IE_{SN}}$

a = Einwaage der Neoquassin-Standardsubstanz in mg

IE_{AN} = Integratoreinheiten Neoquassin (Analyse)

IE_{SN} = Integratoreinheiten Neoquassin (Standard)

3) Der Gesamtgehalt ergibt sich aus der Summe von Quassingehalt und Neoquassingehalt.

C. Densitometrische Direktauswertung der Bitterstoffzonen mit dem HPDC-Scanner

Analysenextrakt: Wie bei der DC-Methode (s.S. 100) bereitet.

Standardlösungen: Jeweils 10 mg Quassin bzw. Neoquassin werden in einem 10 ml-Meßkölbchen mit Methanol p.a. zur Marke aufgefüllt.

Gerätebeschreibung und Meßbedingungen:

Adsorbens:

HPTLC-Fertigplatten 10 x 10 cm Fa.Merck, Art.Nr.5628, mit Fluoreszenzindikator, für die Nano-DC)

Probenauftrag:

Das Auftragen der Analysen- bzw. Standardlösungen erfolgte mit dem Nanomat-Mikrodosierer (Fa.Camag) in Mengen von 1 - 4 µl punktförmig jeweils im 60°-Abstand auf der Peripherie eines Kreises (Ø = 1.5 cm) um den Mittelpunkt der Kieselgelplatten.

Entwicklung der Platten:

Die Chromatogramme wurden nach der Zirkularmethode (U-Kammer System nach Kaiser, Fa.Camag) im Laufmittel Chloroform-Methanol (99:1) entwickelt und anschließend getrocknet.

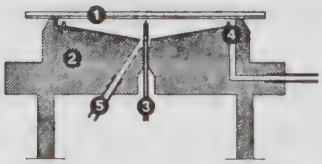


Abb. 32
U-Kammer: System nach KAISER

Die HPTLC-Platte (1) vom Format 100 x 100 mm lag in einem Haltering mit der Schicht nach unten auf dem Körper (2) der U-Kammer. Aus der Zentralkapillare (3) aus Platin - Iridium von 0.2 mm lichter Weite wurde das Fließmittel zugeführt. Durch

den Ringspalt (4) konnte die Kammer vor, während und nach der Entwicklung mit Gas durchströmt werden.

Die Fließmittelzuführung erfolgte aus einer geschlossenen 250 µl Spritze, die in den Dosierturm eingespannt war und mittels Schrittmotor betätigt wurde. Die Regelung erfolgte elektronisch, wobei das vorgewählte Fließmittelvolumen der Schicht mit konstanter Flußrate zugeführt wurde.

(Entwicklungsdauer eines Chromatogrammes: ca. 3 Min.)
(Laufmittelverbrauch: ca. 0.2 ml)

Messung der Bitterstoffzonen:

Die UV-Absorptionsmessung der Bitterstoffzonen erfolgte densitometrisch mit dem HPDC Scanner (Fa.Camag).
Wellenlänge: 254 nm
Spalt: 2 x 0.3 mm
Scan-Geschwindigkeit: 0.5 mm/sec.
Auswertung: Radial
Berechnung der Peakflächen: Digital mit Integrator "LDC-308" (Fa.Camag)

Linearität der Eichgeraden:

Auftragsmenge: Jeweils 1, 2, 3, 4 µl Quassin- bzw. Neoquassin-Standardlösung. Von jeder Auftragemenge wurden pro Standard je 5 Parallelversuche durchgeführt. Die Meßpunkte für die Eichgeraden ergaben sich aus den Mittelwerten der 5 Parallelversuche. Die Eichgeraden für Quassin und Neoquassin verliefen im Meßbereich linear (siehe S. 106).

Statistische Auswertung der densitometrisch ermittelten Meßdaten

Eichgeraden von Quassin- und Neoquassin-Standard nach zirkular-chromatographischer Auftrennung.

1. Quassin

Auftrage-menge	Integratoreinheiten (IE) x 100					m	x
1 µl	357.8	361.8	360.4	348.0	347.8	355.1	355.1
2 µl	728.0	735.5	740.2	735.0	729.8	734.1	367.05
3 µl	999.7	1100.3	1080.4	1068.3	1196.3	1089.0	363.0
4 µl	1403.2	1380.2	1390.8	1396.0	1455.8	1405.2	351.3

Fehlerrechnung: für $x = \frac{IE}{\mu l}$

Mittelwert	$\bar{x}$	=	359.1
Standardabweichung	S	=	7.1754
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	=	2.5368
Variabilitätskoeffizient	V	=	∓1.99%

2. Neoquassin

Auftrage-menge	Integratoreinheiten (IE) x 100					m	x
1 µl	368.4	359.9	370.3	371.4	370.0	368.0	368.0
2 µl	738.8	743.7	751.0	735.7	735.4	740.8	370.4
3 µl	1130.4	1104.6	1030.2	1085.7	1249.1	1120.2	372.4
4 µl	1414.7	1380.0	1470.4	1504.8	1481.5	1450.3	362.5

Fehlerrechnung für $x = \frac{IE}{\mu l}$

Mittelwert	$\bar{x}$	=	368.32
Standardabweichung	S	=	4.2797
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss	=	1.5131
Variabilitätskoeffizient	V	=	∓1.16%

Durchführung der Analyse:
Auftragemenge: Jeweils 2 µl der Analysen-bzw. Standardlösungen wurden mit dem Auftragegerät (Nanomat) auf die Kieselgelplatten punktförmig aufgetragen (6 Punkte pro Platte in 60^{o} Abstand).

Berechnung des Gehalts: Analog der HPLC-Integrator-Auswertung (S. 103).

11.3 Sensorische Bitterwertbestimmung

Die Bitterwerte (BW) der Reinsubstanzen wurden mit 5 Prüfern, die der Drogenextrakte mit 2 Prüfern in Anlehnung an die Vorschrift des DAB 7, Ziffer 84, ermittelt.

Abweichend vom Deutschen Arzneibuch bestimmten wir keine Mindestanforderungen, sondern die absoluten Bitterwerte.

Allgemeine Prüfbedingungen

1. Die Testlösungen wurden in gleichen Volumina (jeweils 20 ml), bei der höchsten Verdünnung beginnend, in Einmal-Kunststoffbechern gekostet.
2. Alle Verdünnungen wurden mit Trinkwasser bereitet (Temperatur: konstant 20^{o}C).
3. Zur Geschmacksprobe wurden die Testlösungen 30 Sek. im Mund hin- und herbewegt.
4. Nach einer als bitter empfundenen Lösung muß der Test für mindestens 15 Min. unterbrochen werden.
5. Korrekturfaktor $\bar{K}$
   Der persönliche Korrekturfaktor $\bar{K}$ wurde von jedem Prüfer - im Gegensatz zum DAB 7 - vor und nach jeder Testserie bestimmt und aus dem Mittelwert beider Daten gebildet.

$$\bar{K} = \frac{\frac{5.00}{a} + \frac{5.00}{b}}{2}$$

a = Milliliter Stammlösung (nach DAB 7) in der als bitter empfundenen Verdünnung vor der Testserie.

b = Milliliter Stammlösung in der als bitterempfundenen Verdünnung nach der Testserie.

(Differierten die Werte a und b um mehr als 3 DAB 7-Standard-Verdünnungsstufen, wurden die Ergebnisse der sensorischen Analyse nicht gewertet).

Bitterwertbestimmung der Drogenauszüge:
Abweichend von der DAB 7-Vorschrift extrahierten wir die Bitterstoffe mit 150 ml einer Äthanol-Wasser (30:70)-Mischung aus 1.0 g fein pulverisierter Droge.
(Extraktionsgerät: Omnimix (8000 U/Min); Extraktionszeit: 5 Min.).
Nach dem Entfernen des Äthanols am Rotationsverdampfer (Einengen des Extrakts auf 100 ml) wurde die Lösung filtriert und der Rückstand dreimal mit 50 ml heißem Wasser nachgespült. Die vereinigten Filtrate füllten wir anschließend in einem 1000 ml-Meßkolben mit Wasser zur Marke auf.

= Verdünnung A (1:1000)
50.0 ml Verd. A zu 500.0 ml Wasser ergaben Verdünnung B (1:10 000)

Die sensorische Analyse wurde in zwei Schritten durchgeführt.

1. Bestimmung des Grenzkonzentrationsbereiches
   Ausgehend von der größten Verdünnung 1:100 000 (10.0 ml Lsg. B zu 100 ml Wasser verdünnt) wurden solange um den Faktor 10 000 konzentriertere Lösungen getestet, bis ein bitterer Geschmack erkannt wurde.

2. Bestimmung der Feinschwelle
   In dem unter 1. ermittelten Grenzkonzentrationsbereich (z.B. 1:50 000) bestimmten wir - von der höchsten Verdünnung ausgehend - die Feinschwelle, wobei die Bitterstoffkonzentrationen der Einzellösungen jeweils um den Faktor 1000 zunahmen. (z.B. 1:55 000 - 1:54 000 - 1:53 000).

Berechnung des korrigierten absoluten Bitterwerts:

$$BW = \frac{B}{\bar{K}}$$

B = Reziproker Wert derjenigen Verdünnungskonzentration, die gerade noch als bitter empfunden wurde (Feinschwelle)
$\bar{K}$ = Mittelwert des Korrekturfaktors (siehe Allg.Prüfbedingungen)

Bitterwertbestimmung der Reinsubstanzen: *)

Jeweils 1 ml der äthanolischen Substanzlösung (10.0 mg/10 ml) wurden in einen 1000 ml-Meßkolben pipettiert und mit Trinkwasser zur Marke aufgefüllt.
= Verdünnung A (1 : 1 000 000)

Wie beim Drogenextrakt bestimmten wir zunächst in Schritten von 1 : 5 000 000 (bei einer Verdünnung von 1 : 20 000 000 beginnend) den Grenzkonzentrationsbereich, während die Feinschwelle in Verdünnungsschritten von 1 : 500 000 ermittelt wurde.

Ergebnisse: (Zusammengefaßt in Tab. 14)

T a b e l l e 14

Bitterwerte der Drogenauszüge

Droge	Extrakt Nr.	Einzel-Bitterwerte (in Tausend)				Mittlere BW (in Tausend)
		I (Prüfer)		II		
Surinam-Quassia	1	50	47	50	54	50.2
	2	29	31	33	33	31.5
Jamaika-Quassia (Handels-Droge = Jamaika-Quassia)	3	39	42	43	45	42.2
	4	47	50	45	48	47.5
	5	64	71	65	68	67.0
	6	46	50	55	56	51.7
	7	39	36	41	42	39.5
	8	33	36	36	35	35.0

*) Die sensorischen Bitterwertbestimmungen wurden von Frl.Klapfenberger, Frau Nägel, Frau Sichart, Herrn Brüning und Herrn Flitsch am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München durchgeführt, wofür ich mich besonders bedanken möchte.

Tabelle 15

Sensorische Bitterwerte der Reinsubstanzen

Substanz	korrigierte Einzelbitterwerte (in Mio)										Mittlerer BW (in Mio)
	I		II		III		IV		V		
Quassin	16.5	16.8	17.6	18.6	15.8	18.4	16.2	17.7	16.8	17.8	17.2
Neoquassin	16.2	16.5	16.0	16.0	14.6	15.8	16.0	16.8	17.1	17.0	16.2
18-Hydroxy-Quassin	9.9	12.2	10.9	12.5	9.9	12.0	11.3,	12.8	12.9	13.6	11.8
Quassin-Mischung (Fa.Roth)*)	15.0	17.0	16.2	15.5	13.6	16.7	16.0	14.5	16.7	15.8	15.7

Fehlerrechnung:		Quassin	Neoquassin	18-Hydroxy-Quassin	Quassin/ Handel
Mittelwert	$\bar{x}$ =	17.22	16.21	11.8	15.7
Standardabweichung	S =	0.9390	0.7233	1.2657	1.0760
Mittlerer Fehler der Standardabweichung	Ss =	0.2099	0.1617	0.2830	0.2406
Variabilitätskoeffizient	V =	∓5.45%	∓4.46%	∓10.72%	∓6.85%

*) Mischprobe aus 4 Chargen

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) F.W.FREISE, Dtsch.Apoth.Ztg. 49, 1114 (1937)
2) G.KARSTEN, U.WEBER u. E.STAHL, Lehrbuch der Pharmakognosie, 9.Auflage, Gustav Fischer-Verlag Stuttgart (1962), S. 162 ff.
3) Dispensatory of the USA, part. I, 1152 (1960)
4) F.GILLING, Pharm.J. 63, 30 (1908)
5) F.BERGER, Handbuch der Drogenkunde, Bd. III, Maurich-Verlag, Wien (1952), S. 486 ff.
6) E.WEIGERT u. P.J.SCHORN, Tribuna Pharmaceutica 30, 48 (1962)
7) F.L.WINCKLER, Report.Pharm. 4, 85 (1835)
8) E.P.CLARK, J.Amer.Chem.Soc. 59, 927 (1937) und 59, 511 (1937)
9) A.CHRISTENSEN, Arch.Pharm. 220, 481 (1882)
10) F.MASSUTE, Arch.Pharm. 228, 147 (1890)
11) R.ADAMS u. W.M.WHALEY, J.Amer.Chem.Soc. 72, 375 (1950)
12) E.LONDON, A.ROBERTSON u. H.WORTHINGSTON, J.Chem.Soc. 3431 (1950)
13) R.J.S.BEER, D.B.G.JAQUISS, A.ROBERTSON u. W.E.SAVIGE, J.Chem.Soc. 3672 (1954)
14) K.R.HANSON, D.B.JAQUISS, J.A.LAMBERTON, A.ROBERTSON u. W.E.SAVIGE, J.Chem.Soc. 4238 (1954)
15) R.J.S.BEER, K.R.HANSON u. A.ROBERTSON, J.Chem.Soc. 3280 (1956)
16) Z.VALENTA, S.PAPADOPOULOS u. C.PODESVA, Tetrahedron 15, 100 (1961)
17) C.G.CASINOVI, P.CECCERELI u. G.GRANDOLINI, Ann.Ist.Super. Sanita (Italien) 2, 414 (1966)
18) Z.VALENTA, A.H.GRAY, D.E.ORR, S.PAPDOPOULOS u. C.PODESVA, Tetrahedron 18, 1433 (1962)
19) J.MORON, i- J.POLONSKY, Tetrahedron Lett. 385 (1968)
20) J.MORON, J.RONDEST u. J.POLONSKY, Experientia 22, 511 (1966)
21) D.ARIGONI, Diogenesis of terpenes in moulds and higher plants, in Ciba Symposium on the Biosynthesis of Terpenes and Sterols, J. u. A. CHURCHILL, London (1959), S. 231 ff.
22) J.R.DIAS u. R.RAMACHANDRA, Tetrahedron Lett. 3685 (1976)
23) J.R.DIAS u. R.RAMACHANDRA, J.Org.Chem. 42, 1613 (1977)
24) J.R.DIAS, R.RAMACHANDRA u. B.NASSIM, Org.Mass Spectrometry 13, 307 (1978)
25) J.R.DIAS u. R.RAMACHANDRA, J.Org.Chem. 42, 3584 (1977)
26) R.HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Band 6, Birkhäuser-Verlag Basel u. Stuttgart (1973), S. 395 ff.
27) D.LAVIE u. J.KAYE, J.Chem.Soc. 5001 (1963)
28) J.POLONSKY u. E.LEDERER, Bull.Soc.Chim. 2, 1157 (1959)
29) G.DRAGENDORFF, Die Heilpflanzen verschiedener Völker und Zeiten, Verlag Fritsch, München (1898), S. 365
30) N.AMIN, Quart.J.P. 18, 116 (1945)
31) R.ANTIBON, Arch.internat.pharmacodyn.therap. 33, 78 (1927), zit.in: The Dispensatory of the USA, Part. I, S. 1152 (1960)
32) P.WEGER, Arch.f.experiment.Path.u.Pharmakol. 144, 261 (1928)
33) R.BUSBEY, US Dept.Agric., Bur.Entomol.Plant.Quarrant. E-483 (1939), zit.in: Fortschr.der Chemie organischer Naturstoffe, L.ZECHMEISTER, Bd. 10, Springer-Verlag (1953), S. 461
34) E.Mc.GOVRAN, E.MAYER u. E.P.CLARK, US Dept.Agric.Bur. Antomol.Plant.Quarant., E-572 (1942), Zit. in Fortschr.der Chemie organischer Naturstoffe, L.ZECHMEISTER, Bd. 10, Springer-Verlag, Wien (1953), S. 461

35) Cancer Treatment Reports, US Dept. of Health, Education and Welfare, Vol. 60, 8 (1976), S. 1041
36) M.REITER, Arzneimittelforschung 17, 1249 (1967)
37) A.KOMAROWSKY, Chemiker-Ztg. 27, 1806 (1903)
38) N.R.FARNSWORTH, N.A.PILEWSKI u. F.J.DRAUS, Lloydia 25, 312 (1962)
39) R.BRÜNING, Dissertation in Vorbereitung, Universität München (1979)
40) C.C.J.CULVENOR u. J.S.FITZGERALD, J.Pharm.Sci. 52, 303 (1963)
41) M.HESSE in: Indolalkaloide, Verlag Chemie, Vol.1 (1974) S. 110
42) G.C.LEVY, V.EDLUND u. J.G.HEXEM, J.Mag.Res. 19, 259 (1973)
43) E.SANCHEZ u. J.COMIN, Phytochemistry 10, 2155 (1971)
44) H.ACHENBACH u. K.BIEMANN, J.Amer.Chem.Soc. 87, 4178 (1965)
45) S.R.JOHNS, J.LAMBERTON u. A.SIOUMIS, Austr.J.Chem. 23, 629 (1969)
46) N.BOURGUIGNON ZYLBER u. J.POLONSKY, Bull.Chim.Therapeut. 396 (1970)
47) E.WENKERT, J.C.ORR, S.GARATT, J.HANSEN, B.WICKBERG u. C.L. LEICHT, J.org.Chem. 27, 4123 (1963)
48) E.R.NELSON u. J.R.PRICE, Austral.J.Sci.Res. 5, 563 (1952)
49) A.T.AWAD, J.L.BEAL, S.K.TALAPATRA, M.P.CAVA, J.Pharm.Sci. 56, 279 (1967)
50) D.DELLA CASA u. M.SOJO, J.Chem.Soc. C, 2155 (1967)
51) H.F.HAYNES, E.R.NELSON u. J.R.PRICE, Austral.J.Sci.Res. A 5, 387 (1952)
52) H.B.MAC PHILLAMY, pers.Mitteilung in H.F.MANSKE "The Alkaloids" Vol.VIII, Academic Press New York, London (1965), S. 250 ff.
53) T.OHMOTO, R.RANAKA u. T.NIDAIDO, Chem.Pharm.Bull.Japan 24, 1532 (1976)
54) Y.KIMURA, M.TAKIDO u. S.KOIZUMI, J.Pharm.Soc.Japan 87, 1371 (1967)
55) S.BLADT, Dissertation Universität München (1974)
56) S.UDENFRIEND, B.WITKOP, B.C.REDFIELD u. H.WEISSBACH, Biochem. Pharmacol. 1, 160 (1958)
57) D.H.AARONS, G.V.ROSSI u. R.F.ORZECHOWSKI, J.Pharm.Sci. 66, 1244 (1977)
58) S.GERSHON u. W.J.LANG, Arch.Int.Pharmacodyn.Ther. 31, 135 (1962)
59) Codex Medicamentarius Gallicus 6^{e} Edition, Imprimerics Oberthur, Rennes (1937), S. 768
60) HAGER's Handbuch der Pharm.Praxis, 2.Band, Springer-Verlag Berlin (1949), S. 539
61) HAGER's Handbuch der Pharm.Praxis, 2.Band, Springer-Verlag Berlin (1958), S. 1472
62) British Pharmaceutical Codex, The Pharmaceutical Press, London (1968)
63) Pharmacopea Danica IX, Nordisk-Forlag, Kobenhavn (1948) S. 456
64) H.WAGNER u. K.MÜNZING-VASIRIAN, Dtsch.Apoth.Ztg. 115, 1233 (1975)
65) G.TITTEL, Dissertation Universität München (1979)
66) J.S.MATTHEWS, Biochim. et Biophys.Acta 69, 163 (1963)
67) R.KÄMPF, Schweizer Apoth.Ztg. 111, 195 (1973)
68) F.KORTE, Chem.Ber. 88, 704 (1955)
69) G.SCHNEIDER u. B.MIELKE, Dtsch.Apoth.Ztg. 118, 469 (1978)

70) C.H.BRIESKORN, Pharmazie in unserer Zeit 7, 143 (1978)
71) R.M.HOROWITZ u. B.GENTILI, Tetrahedron 19, 773 (1973)
72) DAB 7-Kommentar (1968), S. 91
73) Merck-Index, 8.Ausg. (1968) S. 898

74) R.E.KAISER, Einführung in die HPDC, Eigenverlag des Inst. für Chromatographie, Bad Dürkheim (1978)
75) R.MUNIER, M.MACHEBOEUFF, Bull.Soc.Chim.Biol. 33, 846 (1951)
76) L.HÖRHAMMER, H.WAGNER u. G.BITTNER, Arzneimittel-Forsch. 13, 537 (1963)
77) M.L.LEWBART, W.EHRLI u. T.REICHSTEIN, Helv.Chim.Acta 46, 505 (1963)
78) E.STAHL, Chemiker Ztg. 82, 323 (1958)
79) W.PESCHKE, J.Chromatogr. 20, 572 (1965)
80) C.E.SWANHOLM, H.ST.JOHN u. P.J.SCHEUER, Pacific Sci. 13, 295 (1959)
81) J.TRAVELL, J.Amer.Pharm.Assoc. 33, 689 (1934)
82) C.C.FULTON, Am.J.Pharm. 104, 244 (1932)
83) J.C.MUNCH, F.C.CROSSLEY u. W.M.HARTUNG, J.Am.Pharm.Assoc. 20, 1037 (1931)

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Wagner für die Anregung und stete Förderung meiner Arbeit.

Herrn Dr. A. Neszmelyi, Budapest, danke ich für ^{13}C-NMR-Spektren und wertvolle Diskussionen im Verlauf der Strukturaufklärung von Alkaloid I.

Herrn Professor Dr. M. Reiter, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Technischen Universität München, bin ich für die Durchführung der pharmakologischen Tests zu großem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. O. Seligmann danke ich für stete Diskussionsbereitschaft und unzählige H-NMR- und Massenspektren.

Die Durchführung der HPLC-Trennungen besorgte Herr Dr. G. Tittel, dem ich dafür Dank schulde.

L E B E N S L A U F

Thomas N e s t l e r	geboren am 29.6.1948 in Geislingen/St.	
Eltern:	Alexander Nestler, Dipl.Chem. und Herta Nestler, geb. Vogt, Dipl.Chem.	
Wohnort:	München	
Schulbildung:	1954 - 1959	Volksschule München
	1959 - 1968	Realgymnasium München
Berufsausbildung:	1968 - 1970	Praktikant in der Elisabeth-Apotheke am Nordbad, München
Pharm.Vorprüfung:	20.9.1970	München
Studium der Pharmazie:	WS 1971/72 bis WS 1974/75	Phil.Theol.Hochschule Passau und Ludwig-Maximilians-Universität München
Pharm.Staatsprüfung:	13.5.1974	
Approbation:	2.6.1974	
Wissenschaftliche Tätigkeit:	1.7.1974 bis 31.12.1978	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München Promotionsarbeit unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner